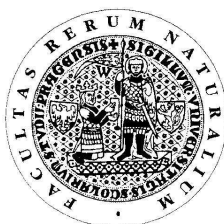


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Chemie  
Studijní obor: Analytická chemie



Blanka Vochoňová

## ELEKTROFORETICKÉ SEPARACE SACHARIDŮ V KRÁTKÉ KAPILÁŘE

Electrophoretic Separations of Saccharides in Short  
Capillary

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Prof. RNDr. František Opekar CSc.

Praha 2012

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857 a za podpory Grantové Agentury České republiky, grant č. P206/10/1231.

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne

## Poděkování

Srdečně děkuji svému školiteli Prof. RNDr. Františkovi Opekarovi CSc. za cenné rady, odborné vedení, ochotu, vstřícnost a pomoc při zpracování této diplomové práce a dále Doc. RNDr. Ing. Petrovi Tůmovi Ph.D. za věcné připomínky k tématu. Také bych ráda poděkovala své rodině za podporu.

## Abstrakt

Byl vyvinut nový laboratorní systém pro rychlé elektroforetické separace anorganických a organických iontů. Použita byla křemenná kapilára v kombinaci s bezkontaktní vodivostní detekcí. Základní funkce systému byly ověřeny na směsi anorganických iontů. Systém byl dále použit k separacím neutrálních mono- a disacharidů. Modelová směs obsahovala pět sacharidů (sacharózu, laktózu, glukózu, fruktózu a ribózu). Vyvinutá metoda byla použita ke stanovení sacharózy, glukózy a fruktózy v energetických nápojích.

Klíčová slova: kapilární elektroforéza, krátká kapilára, sacharidy, energetické nápoje

## Abstract

A new laboratory system has been developed for rapid electrophoretic separations and determinations of inorganic and organic ions. The instrument employs short fused silica capillary in combination with contactless conductivity detection. The basic functions of the apparatus have been tested using mixture of inorganic ions. It has further been applied to separations of neutral mono- and disaccharides. The model mixture contains five saccharides (sucrose, lactose, glucose, fructose and ribose). The technique developed has been used to determine sucrose, glucose and fructose in high-energy drinks.

Key words: capillary electrophoresis, short capillary, saccharides, energy drinks

# Obsah

Seznam zkratk	7
Předmluva a cíl práce	9
1. Úvod	10
1.1 Kapilární elektroforéza	10
1.1.1 Historie	10
1.1.2 Princip kapilární elektroforézy	10
1.1.3 Kapilára	11
1.1.4 Detekční techniky v CE	12
1.1.5 Miniaturizace v CE	13
1.1.6 Sacharidy	14
1.1.7 Separace a stanovení sacharidů	16
2. Experimentální část	19
2.1 Popis aparatury	19
2.1.1 Elektroforetická část aparatury	20
2.1.2 Elektronická část aparatury	21
2.2 Používané chemikálie	22
2.3 Pracovní postup	22
2.4 Vyhodnocování experimentálních výsledků	23
3. Výsledky a diskuze	25
3.1 Testování základních vlastností elektroforetického systému	25
3.1.1 Stanovení separačních parametrů pro anorganické ionty	25
3.1.2 Kalibrační závislosti	28
3.1.2.1 Kalibrační závislost pro draselný ion	28
3.1.2.2 Kalibrační závislost pro lithný ion	31
3.1.3 Porovnání vlastností křemenné a PEEK kapiláry	33
3.2 Separace a stanovení sacharidů	34
3.2.1 Sledování vlivu druhu hydroxidu	34
3.2.2 Separace sacharidů v modelových roztocích	36
3.2.3 Koncentrační závislosti v modelových roztocích	40

3.2.4 Stanovení sacharidů v energetických nápojích	42
4. Závěr	45
Použitá literatura	46

## Seznam zkratk

C <sup>4</sup> D	bezkontaktní vodivostní detekce ( <b>C</b> apacitively <b>C</b> oupled <b>C</b> ontactless <b>C</b> onductivity <b>D</b> etection)
CCD	bezkontaktní vodivostní detekce ( <b>C</b> ontactless <b>C</b> onductivity <b>D</b> etection)
CE	kapilární elektroforéza ( <b>C</b> apillary <b>E</b> lectrophoresis)
CZE	kapilární zónová elektroforéza ( <b>C</b> apillary <b>Z</b> one <b>E</b> lectrophoresis)
DAD	detektor diodového pole ( <b>D</b> iode <b>A</b> rray <b>D</b> etector)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EOF	elektroosmotický tok
ESI	ionizace elektrosprejem ( <b>E</b> lectro <b>S</b> pray <b>I</b> onisation)
ETFE	ethylen-tetrafluorethylen
FID	plamenový ionizační detektor ( <b>F</b> lame <b>I</b> onization <b>D</b> etector)
Fru	fruktóza
GC	plynová chromatografie ( <b>G</b> as <b>C</b> hromatography)
Glu	glukóza
His	histidin
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie ( <b>H</b> igh <b>P</b> erformance <b>L</b> iquid <b>C</b> hromatography)
Lak	laktóza
LIF	laserem indukovaná fluorescenční detekce ( <b>L</b> aser <b>I</b> nduced <b>F</b> luorescence)
LDR	lineární dynamický rozsah ( <b>L</b> inear <b>D</b> ynamic <b>R</b> ange)
LOD	detekční limit ( <b>L</b> imit <b>O</b> f <b>D</b> etection)
MES	kyselina morfolinoethansulfonová
MS	hmotnostní spektrometrie ( <b>M</b> ass <b>S</b> pectrometry)
PAD	pulsní ampérometrická detekce ( <b>P</b> ulsed <b>A</b> mperometric <b>D</b> etection)
PEEK	polyether ether keton
PMMA	poly(methylmethakrylát)
Rib	ribóza
RID	refraktometrická detekce ( <b>R</b> efractive <b>I</b> ndex <b>D</b> etection)
Sach	sacharóza
UV	ultrafialové záření

$A$	plocha píku
$B$	směrnice regresní přímky
$c$	koncentrace
$E$	intenzita elektrického pole
$h$	výška píku
$H$	výškový ekvivalent teoretického patra
$k_n$	tabelovaný koeficient
$K_n$	tabelovaný koeficient
$l$	efektivní délka kapiláry
$L$	délka kapiláry
$L_{1/2}$	interval spolehlivosti
$n$	počet teoretických pater
$N$	počet experimentálních bodů
$R$	korelační koeficient rozpětí
$S_D$	standardní chyba regresní analýzy
$t_{mig}$	migrační čas
$U$	separační napětí
$w$	šířka píku
$w_{1/2}$	šířka píku v polovině výšky
$\tilde{x}$	medián
$\mu_{eff}$	efektivní elektroforetická mobilita
$\mu_{eof}$	elektroforetická mobilita neutrální molekuly



## Předmluva a cíl práce

Kapilární elektroforéza zaznamenala v uplynulých dvaceti letech velký rozvoj. Je to účinná metoda, která je jednoduchá, poměrně levná a všestranná. Umožňuje analyzovat látky různého původu a to jak anorganického tak organického. Nachází proto uplatnění v chemických, farmaceutických, genetických, klinických i potravinářských laboratořích. Stejně jako v ostatních instrumentálních analytických metodách, je i v kapilární elektroforéze trendem současnosti miniaturizace. Jednou z možností, jak miniaturizovat elektroforetický systém, je použití speciálních elektroforetických čipů. Ty mohou být skleněné nebo plastové. Vyžadují ovšem speciální instrumentaci a jsou poměrně drahé. Další variantou je použití krátkých kapilár. Obě dvě tyto možnosti se vyznačují vysokou separační účinností, výrazným zkrácením doby separace a velmi malou spotřebou vzorků i chemikálií.

**Cílem této diplomové práce bylo použít laboratorně sestavenou elektroforetickou aparaturu s krátkou kapilárou k separacím neutrálních mono- a disacharidů.**

**Hlavní úkoly, které byly stanoveny:**

- **testování aparatury při separacích anorganických iontů;**
- **optimalizace podmínek pro separace sacharidů;**
- **separace neutrálních mono- a disacharidů v uměle vytvořené směsi;**
- **stanovení sacharózy, glukózy a fruktózy v reálných vzorcích – energetických nápojích.**

# 1. Úvod

## 1.1 Kapilární elektroforéza

### 1.1.1 Historie

Kapilární elektroforéza je separační metoda, jejímž principem je pohyb nabitých částic v elektrickém poli. Nabitými částicemi mohou být malé anorganické ionty i makromolekuly, např. proteiny [1]. Rychlost pohybu jednotlivých nabitých částic v elektrickém poli je závislá na velikosti jejich náboje a rozměru, neboli na jejich elektroforetické pohyblivosti [2]. Nabité částice se mohou pohybovat přímo ve volném roztoku elektrolytu či v nosném médiu, kterým je například gel.

V roce 1892 byl popsán pohyb anorganických částic v koloidních a brzy na to i ve vodných roztocích [1]. V první polovině dvacátého století docházelo k rozvoji především gelových elektromigračních metod [3]. Roku 1948 obdržel švédský chemik Arne Tiselius Nobelovu cenu za konstrukci zařízení, které umožňovalo dělit proteiny krevního séra na základě jejich rozdílné pohyblivosti v elektrickém poli. V roce 1967 publikoval další ze švédských chemiků - Stellan Hjertén - práci, ve které popsal elektroforetické separace v rotující kapiláře [3]. Výrazný rozvoj elektroforézy byl zaznamenán v osmdesátých letech dvacátého století poté, co roku 1981 američtí vědci J. W. Jorgenson a K. D. Lukacsová popsali separaci různých látek (aminů, dipeptidů či aminokyselin) pomocí zónové elektroforézy v tenké křemenné kapiláře [4, 5]. První komerčně vyráběné přístroje od známých výrobců chemického zařízení byly dostupné v roce 1989 [6].

### 1.1.2 Princip kapilární elektroforézy

Kapilární elektroforéza (CE) je vysoce účinná a citlivá separační technika, která je díky svým nesporným výhodám stále častěji zaváděna v moderních analytických laboratořích [7]. Je metodou jednoduchou, přesnou a umožňuje analyzovat látky ve velmi krátkém čase a s vysokou účinností. Mezi její další výhody patří velmi malá spotřeba vzorků a chemikálií a široké spektrum použitelnosti při analýzách látek různého původu, jako například anorganických iontů, organických molekul či proteinů [8, 9, 10]. Proto CE nachází uplatnění v laboratořích s různým zaměřením,

od environmentálních, přes biomedicínské a klinické až po průmyslové [6, 11].

Transport a separace analytů probíhá v kapiláře. Kapilára propojuje dvě nádoby, které jsou naplněné základním elektrolytem. Tím je naplněna i kapilára. Do základního elektrolytu v koncových nádobkách jsou ponořeny elektrody, kterými je do systému přiváděno elektrické napětí, díky němuž se jednotlivé analyty ve vzorku, lišící se svojí elektroforetickou pohyblivostí, separují [1, 7, 12-14]. Vzorek je dávkován na začátek kapiláry, na jejím konci kapilára prochází detektorem, který zaznamenává průchod zón jednotlivých rozdělených látek. Kapilára bývá obvykle dlouhá 20-100 cm s vnitřním průměrem 10-100  $\mu\text{m}$  [12].

Dávkování může probíhat dvěma způsoby: hydrodynamicky a elektrokineticky. Při hydrodynamickém dávkování je konec kapiláry ponořen do nádoby se vzorkem, v níž se zvýší tlak, jímž je vzorek do kapiláry nadávkován. Je možné též dávkovat tak, že konec kapiláry s nádobkou se vzorkem je zvednut proti koncové nádobce o definovanou vzdálenost po určitou dobu. Po ukončení dávkování je kapilára vrácena zpět do nádoby s elektrolytem a analýza může být spuštěna. Při elektrokinetickém dávkování se nádoba s elektrolytem vymění za nádobku se vzorkem, na definovanou dobu je spuštěno vysoké napětí a tak dojde k nadávkování malého množství vzorku vlivem elektroosmózy. Před spuštěním analýzy je kapilára opět vrácena do nádoby s elektrolytem [1, 3, 7, 12]. Výsledným záznamem je závislost odezvy detektoru na čase, která se nazývá elektroferogram. Kvalitativním údajem z elektroferogramu je migrační čas a kvantitativním výška či plocha píku [7].

### 1.1.3 Kapilára

Kapilára je základní součástí elektroforetického systému, ve které dochází k separaci analytů. Jsou na ni tedy kladeny přísné požadavky, především musí být chemicky i mechanicky odolná. Rychlost elektroosmotického toku (EOF) závisí na materiálu, ze kterého je kapilára vyrobena. Nejčastěji bývají kapiláry vyrobeny z taveného křemene, který všechny požadavky splňuje [15-18]. Samotný tavený křemen je sice velmi křehký, ale kapiláry z něj vyrobené jsou potažené vrstvou polyimidu, který jim dodává pružnost [3]. Na vnitřní straně křemenné kapiláry jsou přítomny silanolové skupiny, které po své ionizaci dávají vzniknout EOF [2].

Další možnou variantou jsou polymerní kapiláry. Jsou chemicky odolné, je možno

je používat, na rozdíl od kapilár křemenných, i v extrémních pH a jsou pružné. Mezi polymerními materiály používanými k výrobě kapilár je například polyether ether keton (PEEK), ethylen-tetrafluorethylen (ETFE) a poly(methylmethakrylát) (PMMA) [15, 16, 18, 19]. Mechanické vlastnosti polymerních kapilár jsou v porovnání s kapilárami křemennými srovnatelné či lepší [17]. Jednou z nevýhod některých polymerních kapilár je, že nejsou propustné pro UV záření. Je tedy nutné použít jinou než UV detekci. Jedním z možných řešení je například bezkontaktní vodivostní detekce [4, 6, 16, 17]. Dále jsou také méně teplotně vodivé, takže při použití vysokých separačních napětí může docházet k nedokonalému odvodu tepla z kapiláry [18].

V kapilárách, které na svém vnitřním povrchu nemají ionizující funkční skupiny (např. kapiláry z materiálu PEEK), je EOF přisuzován adsorpci iontů separačního pufru na povrch kapiláry či stopovým množstvím látek, které jsou obsaženy v materiálu kapiláry. EOF v polymerních kapilárách je tedy menší, než v kapilárách křemenných [17].

Jednou z možností, jak upravovat EOF v křemenných kapilárách, je modifikace jejich vnitřního povrchu vhodným materiálem, například poly(vinylalkoholem), hydroxyethylcelulózou či poly(ethylenglykolem) [18]. Modifikátor EOF je rovněž možno přidávat přímo do separačního elektrolytu.

#### 1.1.4 Detekční techniky v CE

Nečastěji používaným typem detekce v CE je UV absorpční fotometrická detekce. Kapilára prochází přímo detektorem a paprsek je veden detektorovým okénkem, které na křemenné kapiláře vzniká seškrábáním či spálením malé části polyimidové vrstvy. Využitím detektoru s diodovým polem (DAD) se zvyšuje množství informací, které lze z jednotlivých analýz získat. Další možností je fluorescenční detektor, který využívá laserem indukovanou fluorescenci (LIF). Tímto způsobem lze detegovat fluoreskující látky. Pro elektrochemicky aktivní analyty lze použít elektrochemickou ampérometrickou detekci, která je sice citlivá a ekonomicky nenáročná, ale není moc často využívána. Naopak vodivostní detekce se v posledních letech dostává do popředí. Bezkontaktní vodivostní detektor se velmi osvědčil k detekci analytů jako jsou například malé anorganické ionty, či analytů, které nejsou schopny absorbovat UV záření, nebo ho absorbují jen velmi nepatrně, jako například některé aminokyseliny či

sacharidy. Uplatnění v detekci v CE našel i hmotnostní spektrometr, nejčastěji v kombinaci s elektrosprejovou ionizací (ESI-MS) [3, 12, 20].

#### *Bezkontaktní vodivostní detekce*

Bezkontaktní vodivostní detektor (CCD či  $C^4D$ ) byl shledán velmi vhodnou možností, jak účinně a citlivě detegovat malé anorganické ionty a další látky, které nelze stanovit přímou UV detekcí [21-27]. V roce 1998 ho představili nezávisle na sobě ve svých pracích hned dvě skupiny: Zemann a kolektiv a da Silva a kolektiv [24, 28]. Velkou výhodou bezkontaktní vodivostní detekce je, že elektrody nejsou v přímém kontaktu se separačním pufrem a analyzovaným vzorkem. Elektrody jsou umístěny na vnější straně kapiláry, protože vysokofrekvenční signál projde i skrz nevodivou vrstvu, tedy i stěnu kapiláry. Princip  $C^4D$  je poměrně jednoduchý: na jednu z elektrod je přiváděn střídavý signál, který je po průchodu stěnou kapiláry a roztokem snímán druhou z elektrod, usměrněn a registrován [21, 29-31].  $C^4D$  může být realizován několika způsoby: s tubulárními, semitubulárními, planárními či izolovanými drátkovými elektrodami [29]. Elektroferogram je tedy závislostí vodivosti zóny procházející detektorem na čase. Aby bylo dosaženo co největších citlivostí, je zapotřebí, aby vodivost separačního pufru byla co nejrozdílnější od vodivosti zóny analytu [32]. V případě stanovení malých anorganických iontů se například osvědčil pufr, který se skládá z kyseliny morfolinoethansulfonové a histidinu (MES/His), protože jeho vodivost je oproti vodivostem anorganických iontů velmi malá [21].  $C^4D$  se osvědčila jako univerzální detekční technika a lze ji uplatnit i v čipových elektroforetických sestavách [33-35].

#### 1.1.5 Miniaturizace v CE

Miniaturizace analytických přístrojů je trendem posledních let napříč všemi analytickými instrumentálními metodami. Hlavním důvodem pro miniaturizování analytických systémů je snaha zlepšit jejich účinnost za současného zmenšení velikosti. Výhodami jsou menší spotřeby reagentů a vzorků a zrychlení analýz [6, 36, 37,].

Jedním z prvních miniaturizovaných systémů byl roku 1979 plynový chromatograf vyrobený na silikonovém čipu a představený Terrym a kolektivem [38]. V roce 1990 publikoval Manz a kolektiv koncept miniaturizovaného chemického přístroje, ve kterém

byly všechny součásti analytického systému přítomny na silikonovém čipu: předúprava vzorku, separace i detekce [39].

Elektroforetické čipy jsou v dnešní době nejčastěji vyráběny ze skla či plastu. Jejich využití je poměrně široké, například v klinických laboratořích k analýzám proteinů, peptidů, DNA a DNA sekvenování či ve farmaceutických laboratořích k analýzám léků a drog [11, 36, 37].

Další možnou variantou miniaturizace elektroforetického systému je použití krátkých kapilár. Při klasické elektroforéze je kapilára dlouhá 20 až 100 cm. Krátkou kapilárou se rozumí kapilára dlouhá pouze jednotky centimetrů [12, 40, 41]. Obvykle bývají aparatury s krátkou kapilárou sestavovány laboratorně, protože v komerčně dostupných elektroforetických sestavách nelze takto krátké kapiláry používat. Problémy při použití systému s krátkou kapilárou mohou nastat při dávkování, protože s kapilárou dlouhou jednotky centimetrů nelze manipulovat tak snadno, jako s kapilárou o klasické délce. Kapilára tedy bývá v aparatuře zabudovaná fixně v maloobjemových nádobkách, ve kterých jsou ponořeny elektrody. Vzorek tedy bývá nejčastěji dávkován elektrokineticky [40]. Elektroforetický systém s krátkou kapilárou byl využit například při stanovení ofloxacinu a lidokainu v moči [42], při stanovení porfyrinů [43] či při stanovení anorganických aniontů ve sněhu [44], plasmě a mléce [45]. Podrobnosti o možnostech dávkování a detekce v těchto elektroforetických systémech jsou uvedeny v referátové práci [40].

#### 1.1.6 Sacharidy

Název sacharidy pochází z latinského slova saccharum neboli cukr. Jejich biologický význam je rozsáhlý: jsou základním stavebním materiálem rostlinných buněk, zdrojem energie pro rostliny i živočichy, jsou funkčními složkami glykoproteinů, glykolipidů a nukleových kyselin a tvoří součást DNA a enzymů [46]. Studium sacharidů v ovoci, zelenině, medu a dalších přírodních produktech je velmi důležité z hlediska kontroly jejich kvality, pravosti, chuti a způsobu skladování [20, 47]. Některé sacharidy, jako například sacharóza, glukóza a fruktóza jsou častými přídatnými látkami v potravinách a jejich sledování je tedy žádoucí z hlediska zjišťování pravosti potravin či nelegálního přislazování potravin [20, 48, 49].

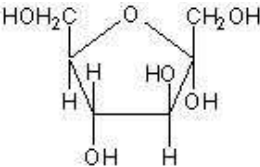
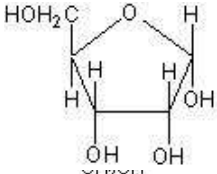
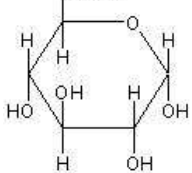
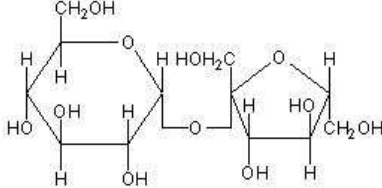
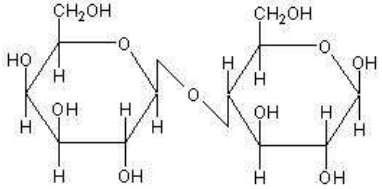
Nejjednoduššími cukry jsou monosacharidy. Dělí se dle přítomnosti aldehydové

nebo ketonové skupiny na aldózy či ketózy a dále podle počtu uhlíkových atomů na tetrózy, pentózy, hexózy atd. Pro každý monosacharid existuje vždy určité množství konfiguračních izomerů: pro aldohexózy je to 16 isomerů (8 L-forem a 8 D-forem), pro ketohexózy je to 8 izomerů (4 L-formy a 4 D-formy). Pokud se sacharidy liší konfigurací pouze na jednom uhlíkovém atomu, nazýváme je epimery (např. D-glukóza a D-galaktóza). Zda sacharidy patří do L- či D- řady je určeno podle shody konfigurace na chirálním atomu uhlíku s nejvyšším pořadovým číslem s koordinací chirálního atomu uhlíku D- či L- glycerinaldehydu. Aldehydová či ketonová skupina v sacharidu intramolekulárně reaguje s alkoholovou skupinou a vzniká tzv. hemiacetal či hemiketal. Ty jsou obvykle znázorňovány Haworthovými projekčními vzorci. Sacharidy, které mají šestičlenný kruh, se dle pyranu označují jako pyranózy. Sacharidy s pětičlenným kruhem se označují podle furanu jako furanózy. Cyklizací tedy vzniká nové chirální centrum a příslušný uhlík nazýváme anomerní. Konfiguraci na anomerním uhlíku označujeme symboly  $\alpha$  a  $\beta$ . Monosacharidy tvoří základní složku nukleových kyselin a jsou důležitou součástí složitých lipidů. Mezi nejznámější monosacharidy patří ribóza, glukóza, mannóza, galaktóza a fruktóza [50-52].

Cukry, které se skládají z několika (obvykle dvou až deseti) kovalentně navázaných monosacharidů, jsou oligosacharidy. Jednotlivé monosacharidy v oligosacharidech jsou spojeny glykosidovou vazbou. Oligosacharidy lze rozdělovat na redukující a neredukující. Redukující oligosacharidy mají volnou anomerní hydroxylovou skupinu, kdežto neredukující nikoliv. Často se slučují s proteiny (glykoproteiny) či lipidy (glykolipidy) a v takovýchto sloučeninách pak mají stavební či regulační funkci. Důležitými oligosacharidy jsou například maltóza, cellobióza, sacharóza a laktóza.

Poslední skupinou cukrů jsou polysacharidy, které se skládají z velkého počtu (obvykle okolo sta) monosacharidů spojených glykosidovou vazbou. Jsou to jedny z nejrozšířenějších sloučenin v přírodě, protože mají spoustu důležitých funkcí: zásobní (glykogen, škrob), ochrannou (slizy), stavební (celulóza, chitin) a mnoho dalších [50, 51].

**Tab. 1.1.** Přehled sacharidů studovaných v této práci, jejich strukturní hemiacetalové vzorce dle Hawortha, triviální a systematické názvy, výskyt a hodnoty  $pK_a$  dle práce [53].

Hemiacetalová forma dle Hawortha	Název	Výskyt a využití	$pK_a$
	<b>fruktóza</b> ( $\alpha$ -D-fruktofuranóza)	v medu a ovoci; je asi o 1/5 sladší než glukóza	12,03
	<b>ribóza</b> ( $\alpha$ -D-ribofuranóza)	součást nukleotidů; fosforylované deriváty se účastní pentózového cyklu	12,11
	<b>glukóza</b> ( $\alpha$ -D-glukopyranóza)	v rostlinách, krvi živočichů, medu; základní a nejrychlejší zdroj energie	12,28
	<b>sacharóza</b> (O- $\alpha$ -D-glukopyranosyl- $\beta$ -D-fruktofuranosid); $\alpha$ -1,2 glykosidová vazba	řepný cukr, nejběžnější sladidlo; metabolický produkt zelených rostlin;	12,62
	<b>laktóza</b> (O- $\beta$ -D-galaktopyranosyl- $\beta$ -D-glukopyranosa); $\beta$ -1,4 glykosidová vazba	mléčný cukr, pouze v mléce v koncentracích od 0 do 7 % v závislosti na živočišném druhu	11,98

### 1.1.7 Separace a stanovení sacharidů

Jednoduché sacharidy v potravinách a nápojích mohou být stanovovány různými metodami. Jednou z nich je plynová chromatografie (GC), nejčastěji ve spojení s plamenově-ionizačním detektorem (FID) či hmotnostním spektrometrem (MS). Před samotnou separací je však třeba sacharidy vhodně derivatizovat, takže metoda není často využívána [54, 55]. Další možností je separace vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) ve spojení s refraktometrickou detekcí (RID) [56] či pulsní ampérometrickou detekcí (PAD) [53]. RID je ale málo citlivý detektor a PAD není



příliš vhodný pro rutinní analýzy [20, 49]. Využití CE k separacím sacharidů má mnoho výhod: na rozdíl od HPLC se při analýze spotřebuje velmi malé množství chemikálií i vzorku, není třeba vzorek před analýzou derivatizovat, kapilára se poměrně snadno promývá čistým pufrem a je tedy schopná brzy po ukončení analýzy opětovného nadávkování nového vzorku [20, 48, 49].

**Tab. 1.2.** *Příklady potravinářských matric, ve kterých byly stanovovány sacharidy různými metodami.*

Metoda	Příklady potravinářských matric	Reference
GC	brambory, jablka, meruňky, whisky, džusy, med, karamel	54, 63, 64, 65, 66
HPLC	víno, pivo, nealkoholické nápoje, džusy, likéry, mléko, med	57, 58, 59, 60, 61, 62
CE	džusy, mléko, jogurty, víno, pivo, alkoholické a nealkoholické nápoje, bonbóny, žvýkačky, instantní káva, sušené mléko, med	48, 49, 67, 68, 69, 70, 71, 72

Separace sacharidů kapilární elektroforézou je možné realizovat několika způsoby [68]. Jedním z nich jsou separace nederivatizovaných forem. V takovém případě je principem separace disociace semiacetalových skupin za vysokého pH. Hydroxylové skupiny v sacharidech mají velmi malé disociační konstanty (od  $10^{-11}$  do  $10^{-13}$ ), tedy vysoké  $pK_a$ , jak je uvedeno v tabulce 1.1, proto je k jejich ionizaci zapotřebí pH větší než 11 [49, 73]. Další možností je derivatizace sacharidů vhodným činidlem. Popsáno bylo například vytvoření komplexů sacharidů s kyselinou boritou [71] či derivatizace kyselinou 4-aminobenzoovou [74].

Důležitý je i výběr vhodné detekční techniky. Sacharidy neabsorbují UV záření, takže nelze použít klasickou UV detekci, ale pouze nepřímou UV detekci. Ta ale není příliš citlivá [49]. Při použití LIF detektoru je nutné sacharidy před separací derivatizovat činidlem, které z nich vytvoří fluoreskující deriváty [75]. Použití MS ve spojení s CE analýzy značně prodražuje a vyžaduje pouze vysoce kvalifikovaný personál [76]. Příma elektrochemická detekce za použití měděných elektrod se také příliš neosvědčila [77]. Vhodnou detekční technikou pro elektroforetické separace nederivatizovaných sacharidů je  $C^4D$ . Zóny separovaných sacharidů jsou detegovány

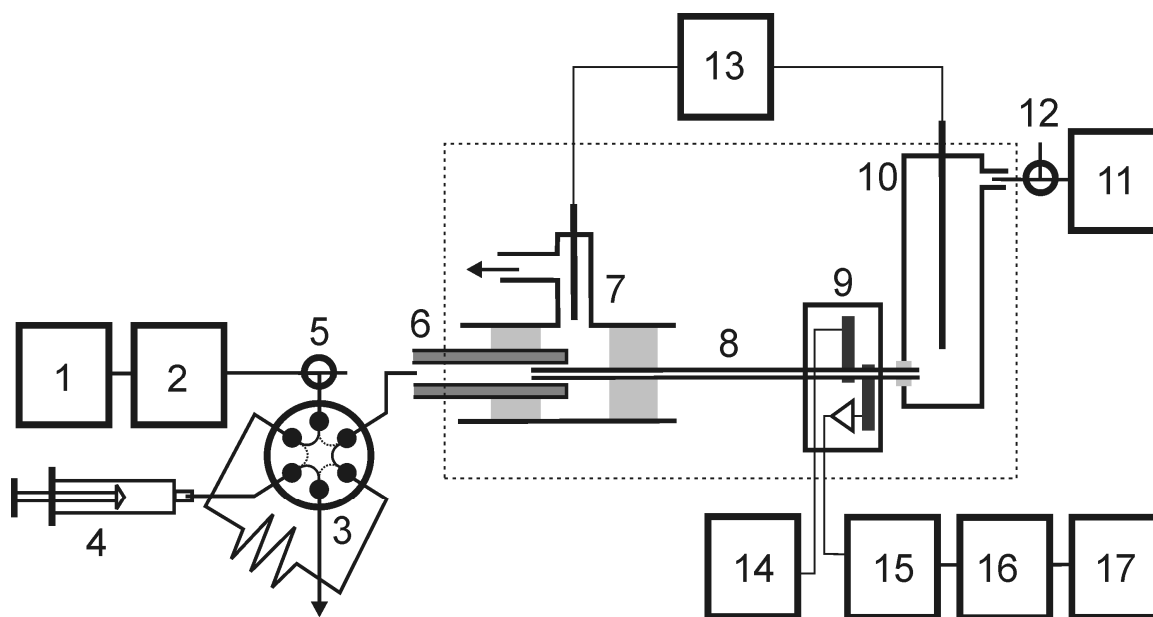
jako negativní pólky, protože mají menší vodivost než separační elektrolyt [47, 78]. Vzhledem k tomu, že anionty putují proti elektroosmotickému toku, jsou tedy disociované sacharidy detegovány až za ukazatelem EOF [79].

## 2. Experimentální část

Sestava aparatury, která byla použita pro elektroforetické separace v krátkých kapilárách, byla obdobná, jako v diplomové práci [80].

### 2.1 Popis aparatury

Vzhledem k tomu, že s krátkou kapilárou nelze manipulovat stejně jako s kapilárou dlouhou desítky centimetrů, musí být aparatura navržena tak, aby bylo možné provést všechny experimentální kroky (především dávkování a promývání) bez nutnosti s kapilárou pohybovat. Na obr. 2.1 je schéma aparatury, která byla pro experimenty v této práci použita.



**Obr. 2.1** Schéma aparatury pro elektroforézu v krátkých kapilárách podle [81].

1 – zásobník separačního pufu, 2 – dávkovací pumpe, 3 – šesticečný dávkovací ventil, 4 – plnění dávkovací smyčky, 5 – třícestný ventil, 6 – PTFE trubička, 7 – dávkovací nádobka se zemnicí elektrodou, 8 – separační kapilára, 9 – detektor, 10 – koncová nádobka s vysokonapěťovou elektrodou, 11 – promývací membránová pumpe, 12 – třícestný ventil, 13 – zdroj vysokého napětí, 14 – zdroj střídavého napětí, 15 – zesilovač, 16 – A/D převodník, 17 – řídicí počítač.

### 2.1.1 Elektroforetická část aparatury

Dávkovací nádobka (7), detektor (9) a koncová nádobka (10) byly upevněny na novodurové destičce, přičemž detektor a koncovou nádobku bylo možno posouvat ve vodorovném směru díky drážkám v nosné destičce. To umožňovalo zapojit do systému kapiláry o různých délkách či měnit efektivní délku kapiláry, tj. délku kapiláry od dávkovacího konce k detektoru.

Dávkování vzorku probíhalo dle principu popsaného v práci [82]. Od dávkovacího ventilu (3) byl vzorek přiváděn PTFE trubičkou (6), která měla vnější průměr 1,58 mm a vnitřní průměr 0,8 mm (Supelco, USA). Dávkovací konec kapiláry byl v prostoru dávkovací nádobky zasunut do ústí PTFE trubičky, asi do hloubky 0,5 mm. Trubička i kapilára byly v dávkovací nádobce fixovány silikonovým těsněním a šroubením. K nadávkování vzorku do kapiláry docházelo tak, že se současně s přepnutím dávkovacího ventilu do polohy „inject“ spustila dávkovací pumpa (2), která pumpovala separační pufr ze zásobní nádobky (1). Proud separačního pufru unášel definovaný objem vzorku z dávkovací smyčky kolem dávkovacího konce kapiláry. Vzorek byl tedy dávkován tak dlouho, jak dlouho byla zóna vzorku v kontaktu s dávkovacím koncem kapiláry. Tato doba se dá řídit průtokovou rychlostí separačního pufru. Přebytečný separační pufr byl po dobu dávkování odváděn do odpadu. Vysoké napětí nebylo při dávkování vypínáno, takže byl vzorek dávkován jak hydrodynamicky tak elektrokineticky.

K pumpování separačního pufru byla použita piezoelektrická pumpa typu mp6 ovládaná mp-x kontrolerem (Bartels mikrotechnik, Německo). Dávkovací ventil byl ovládaný elektronicky, typ C102M (Labio, ČR) s dávkovací smyčkou o objemu 15  $\mu\text{l}$ . Smyčka byla plněna injekční stříkačkou (4). Byly tedy zvoleny následující parametry dávkování: celková doba dávkování (neboli aktivace dávkovací pumpy) 5 s a průtoková rychlost 95  $\mu\text{l s}^{-1}$ . Při těchto podmínkách byla v aparatuře zóna vzorku v kontaktu s dávkovacím koncem kapiláry přibližně 0,3 s (měřeno nadávkováním vzduchové bublinky místo vzorku).

Zpětný ventilek (typ 14039-10, WPI, USA) byl zařazen mezi dávkovací pumpu a dávkovací nádobku kvůli zpětnému toku separačního pufru do zásobní nádobky. Dále zde byl zařazen plastový třicestný ventilek (5) (typ 14035-10, WPI, USA), aby bylo možné do dávkovací nádobky přivádět roztok přímo injekční stříkačkou (například při

aktivaci kapiláry roztokem NaOH či odstranění případných bublinek u ústí kapiláry).

Druhý (výstupní) konec kapiláry byl přiveden do koncové nádoby (10) o objemu 5 ml (plastová nádoba na vzorky, K000737, P-Lab, ČR) skrz stěnu této nádoby. K fixaci výstupního konce kapiláry bylo použito silikonové těsnění. K promývání kapiláry docházelo vytvořením podtlaku v koncové nádobce pomocí membránové pumpy (11) (typ M 4014, JZD Výčapy, ČR). Aby byl podtlak v koncové nádobce vytvořen jen po dobu spuštění membránové pumpy, byl mezi koncovou nádobku a pumpu zařazen elektromagneticky ovládaný třicestný ventil (12) (typ 368131230, ASCO Scientific, USA). Ten zajišťoval hermetické uzavření koncové nádoby po dobu promývání (tedy po dobu aktivace membránové pumpy) a její spojení s okolní atmosférou ihned po vypnutí pumpy.

Vysoké napětí zajišťoval zdroj (13) typu PS 350/5000 (Stanford Research Systems, USA), který poskytoval napětí do 5000 V. Elektrody byly vyrobeny z platinových drátků, vysokonapěťová elektroda byla v koncové nádobce a zemnicí elektroda v nádobce dávkovací.

## 2.1.2 Elektronická část aparatury

V laboratorní aparatuře byl použit bezkontaktní vodivostní detektor  $C^4D$ , jehož podrobný popis lze nalézt v práci [29]. Detekční cela byla sestavena dle práce [83]. Semitubulární hliníkové elektrody, o šířce 1 mm a mezerou mezi nimi také 1 mm, byly vlepeny v drážce vytvořené v plexisklové destičce. Průměr drážky byl roven vnějšímu průměru kapiláry. Aby byla kapilára k elektrodám přitisknutá, byla přikrytá druhou plexisklovou destičkou. Od okolního prostředí byla cela odstíněna kovovou skříňkou, ve které se nacházel i proudový sledovač a usměrňovač. Elektronika detektoru byla založena na obvodu, který byl popsán v pracích [28, 84]. Střídavý signál byl odebírán z laboratorně sestaveného zdroje (14) s integrovaným obvodem MAX 038 (Maxim, USA) [85]. Signál měl frekvenci 320 kHz a amplitudu 18 V. Usměrněný signál z detektoru byl po zesílení zesilovačem (15) registrován 24bitovým A/D převodníkem Panther 1000 (16), který byl řízený programem Ecomac 0,97 (Ecom s.r.o., ČR). Jako spouštěč registrace dat byla využita jednotka Panda 30 také od firmy Ecom. Dávkování vzorku a promývání kapiláry bylo řízeno počítačem (17) vybaveným univerzální měřicí kartou PCI-6034E a programem vytvořeným v LabView (National Instruments, USA).

## 2.2 Používané chemikálie a vzorky

- deionizovaná voda, Milli – Q Plus, Millipore, USA
  - chlorid sodný, p.a., LACHEMA a.s.
  - chlorid draselný, SCHERING a.g. Berlin
  - chlorid vápenatý, p.a., LACHEMA a.s.
  - chlorid lithný, p.a., PENTA
  - 2 – morfolinoethansulfonová kyselina – monohydrát, >99 %, MERCK
  - L – Histidin, >99 %, MERCK
  - acetonitril, >99,8 %, PENTA
  - hydroxid sodný,  $\geq 98$  %, SIGMA
  - hydroxid draselný, p.a., PENTA
  - hydroxid lithný - monohydrát, p.a., MERCK
  - sacharóza, p.a., SIGMA
  - D – laktóza – monohydrát, p.a., SIGMA
  - D – glukóza – bezvodá, p.a., FLUKA
  - D – fruktóza, p.a., SIGMA
  - D – ribóza, p.a., SIGMA
- 
- Red Bull, Red Bull GmbH, Austria
  - KX Energy Stimulation Drink, Cott Beverages Ltd., UK
  - Kamikaze, Tecfood, ČR
  - Burn, Coca-Cola Company

## 2.3 Pracovní postup

Separční elektrolyt byl do systému pumpován ze zásobní plastové nádoby piezoelektrickou pumpou. Vždy před započítáním nové série pokusů byla kapilára aktivována roztokem 0,1 M NaOH asi 10 minut, poté promyta vodou a naplněna příslušným separačním elektrolytem a nechána přibližně 20 minut při napětí 5 kV a procházejícím elektrickým proudem v klidu. Během těchto 20 minut byl stabilizován elektroosmotický tok v kapiláře. Vzorek byl poté dávkován do toku separačního pufru

a v kapiláře docházelo k separaci analytů. Separace probíhala obvykle desítky sekund až jednotky minut, podle zvolených experimentálních podmínek. Mezi jednotlivými separacemi byla kapilára vždy promývána separačním elektrolytem po dobu třiceti sekund a prodlevy mezi dávkováním vzorků byly přibližně jednu minutu. Separační napětí bylo po celou dobu experimentování zapnuto. Při několika denních prodlevách mezi experimenty byla kapilára naplněna deionizovanou vodou.

Všechny vzorky energetických nápojů byly před analýzami zbaveny plynných složek třicetiminutovou sonikací (S15H Elmasonic, P-LAB a.s.), ředěny v poměru 1:50 deionizovanou vodou (Milli-Q) a filtrovány přes membránový filtr 0,45 µm (Millipore, USA).

## 2.4 Vyhodnocování experimentálních výsledků

Migrační časy, výšky, plochy a šířky píků v polovině výšky byly ze získaných elektroferogramů vyhodnocovány programy Origin 6.0 (Microanal Software, USA) a CSW<sup>®</sup> v.1.7 (DataApex s.r.o., ČR).

Střední hodnoty byly vždy mediánem ze souboru hodnot. Rozpětí bylo vypočteno dle vztahu (2-1) a interval spolehlivosti dle vztahu (2-2).

$$R = x_{max} - x_{min}, \quad (2-1)$$

kde  $x_{max}$  je největší zjištěná hodnota v souboru dat a  $x_{min}$  je hodnota nejmenší,

$$L_{1,2} = K_n \cdot R, \quad (2-2)$$

kde  $K_n$  je tabelovaný koeficient a  $R$  je výše uvedené rozpětí. Hodnoty koeficientu byly převzaty ze skript [86].

Separační účinnost byla prezentována počtem teoretických pater  $n$  a výškovým ekvivalentem teoretického patra  $H$ , které byly vypočteny dle vztahů (2-3) a (2-4).

$$n = 16 \cdot \left( \frac{t_{mig,i}}{w_i} \right)^2 = 5,545 \cdot \left( \frac{t_{mig,i}}{w_{1/2,i}} \right)^2 \quad (2-3)$$

$$H = \frac{l}{n}, \quad (2-4)$$

kde  $t_{mig,i}$  je migrační čas analytu  $i$ ,  $w_i$  je šířka píku při základně,  $w_{1/2,i}$  je šířka píku v polovině výšky a  $l$  je délka kapiláry k detektoru.

Rozlišení dvou sousedních píků bylo počítáno dle vztahu (2-5).

$$R_{i,j} = \frac{2 \cdot (t_{mig,i} - t_{mig,j})}{w_i + w_j}. \quad (2-5)$$

Pro výpočty elektroforetických mobilit byly použity následující vztahy:

$$\mu_i = \frac{l \cdot L}{t_{mig,i} \cdot U} \quad (2-6)$$

$$\mu_{eof} = \frac{l \cdot L}{t_{eof} \cdot U} \quad (2-7)$$

$$\mu_{eff} = \mu_i - \mu_{eof} = \frac{l \cdot L}{t_{mig,i} \cdot U} - \frac{l \cdot L}{t_{eof} \cdot U} = \frac{l \cdot L}{U} \cdot \left( \frac{1}{t_{mig,i}} - \frac{1}{t_{eof}} \right), \quad (2-8)$$

kde  $\mu_i$  je elektroforetická mobilita analytu  $i$ ,  $\mu_{eof}$  je elektroforetická mobilita neutrální molekuly, neboli rychlost elektroosmotického toku,  $\mu_{eff}$  je efektivní elektroforetická mobilita,  $l$  je délka kapiláry k detektoru,  $L$  je celková délka kapiláry a  $U$  je použité separační napětí.

Pro výpočty elektroforetických mobilit sacharidů byly použity upravené vztahy, vzhledem k tomu, že sacharidy v silně alkalickém prostředí migrují jako anionty a výpočtem ze vztahu (2-8) vycházejí jejich mobility záporné. Migrační rychlost sacharidů je tedy menší než rychlost elektroosmotického toku. Byl proto použit vztah:

$$\mu_{eff} = \left( \frac{l}{t_{eof}} - \frac{l}{t_{mig}} \right) \cdot \frac{1}{E} = \frac{l \cdot L}{U} \cdot \left( \frac{1}{t_{eof}} - \frac{1}{t_{mig}} \right) \quad (2-9)$$

Podle vztahu (2-9) již vycházely hodnoty elektroforetických mobilit jako kladná čísla [87].

Limit detekce (LOD) byl určován jako trojnásobek standardní chyby regresní přímky  $S_D$  podělený její směrnici  $B$ :

$$LOD = \frac{3 \cdot S_D}{B}. \quad (2-10)$$



### 3. Výsledky a diskuse

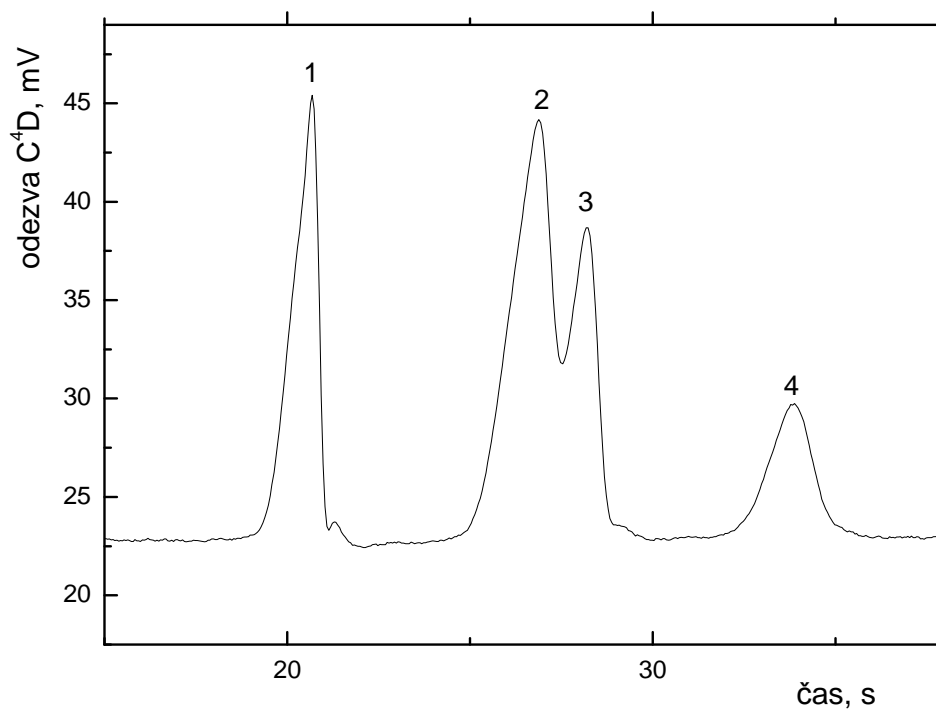
#### 3.1 Testování základních vlastností elektroforetického systému

V první fázi pokusů byla ověřena činnost laboratorní aparatury pro elektroforetické separace v krátkých kapilárách. Ověření spočívalo jednak ve zjišťování vybraných separačních parametrů při separaci anorganických iontů a jednak v určení základních kalibračních parametrů pro jejich stanovení. Měření byla prováděna v křemenné a PEEK kapiláře o vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$ , délce 10 cm a efektivní délce (délce k detektoru) 8 cm. Základní separační podmínky: napětí 5000 V, separační pufr 20 mM MES/His o pH = 6.0 (kontrola pH byla prováděna pH metrem Jenway 3540, P-Lab).

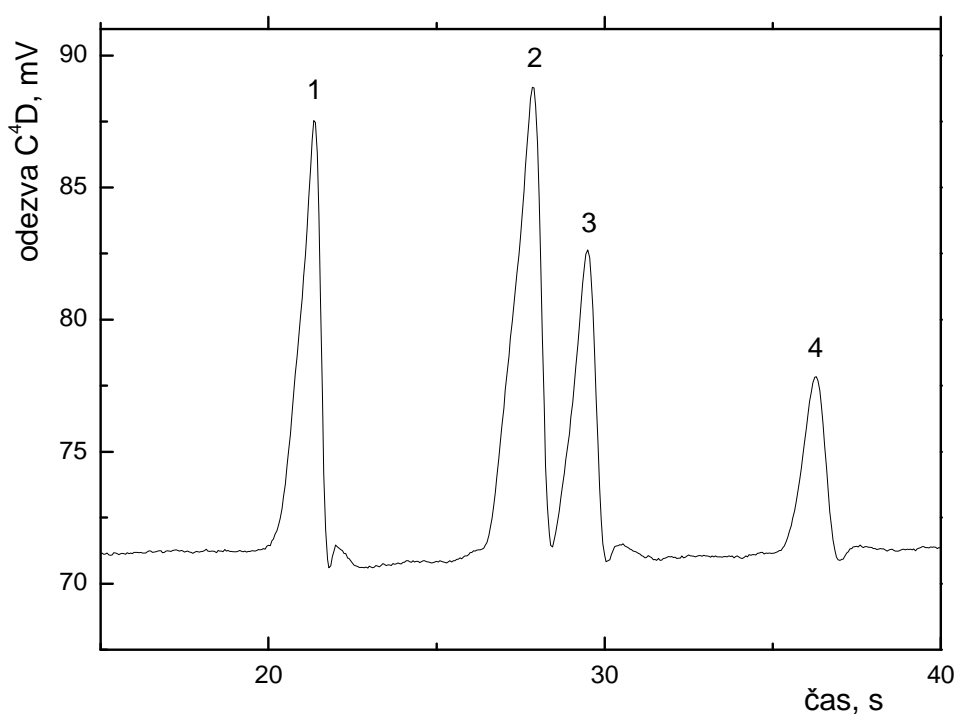
##### 3.1.1 Stanovení separačních parametrů pro anorganické ionty

Nejprve byla opakovaně dávkována směs anorganických iontů  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Li}^+$  o koncentraci  $1 \times 10^{-4}$  M ve vodném roztoku. Z elektroferogramů byly vyhodnocovány separační parametry migrační čas, šířka píku v polovině výšky, výškový ekvivalent teoretického patra a efektivní elektroforetická mobilita draselného a lithného iontu. Pro sodný a vápenatý ion byl též sledován parametr rozlišení. „Water gap“ odezva, neboli odezva na neutrální molekuly vody z nástřikové zóny, udává rychlost elektroosmotického toku a slouží k výpočtu efektivní elektroforetické mobility.

Po získání všech potřebných experimentálních dat na křemenné kapiláře došlo k její výměně za kapiláru z materiálu PEEK (polyether ether keton). Opět byla dávkována směs anorganických iontů o stejné koncentraci a stejném složení jako u kapiláry křemenné a byly zjišťovány separační parametry, které byly následně porovnány s parametry experimentálně zjištěnými při separacích v křemenné kapiláře. Ilustrační elektroferogramy jsou uvedeny na obr. 3.1 a 3.2, vyhodnocené separační parametry získané v obou kapilárách jsou uvedeny v tabulce 3.1.



**Obr. 3.1.** Ukázkový elektroferogram separace směsi anorganických iontů v křemenné kapiláře o vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$  celkové délce 10 cm a efektivní délce 8 cm (5 kV/8  $\mu\text{A}$ , 20 mM MES/His pufr, pH 6,0), koncentrace iontů 100  $\mu\text{M}$ . Identifikace píků: 1 –  $\text{K}^+$ , 2 –  $\text{Ca}^{2+}$ , 3 –  $\text{Na}^+$ , 4 –  $\text{Li}^+$ .



**Obr. 3.2.** Ukázkový elektroferogram separace směsi anorganických iontů v kapiláře z materiálu PEEK o vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$ , celkové délce 10 cm a efektivní délce 8 cm (5 kV/8  $\mu\text{A}$ , 20 mM MES/His pufr, pH 6,0), koncentrace iontů 100  $\mu\text{M}$ . Identifikace píků: 1 –  $\text{K}^+$ , 2 –  $\text{Ca}^{2+}$ , 3 –  $\text{Na}^+$ , 4 –  $\text{Li}^+$ .

**Tab. 3.1.** Přehled sledovaných parametrů a jejich hodnot pro draselný a lithný ion v křemenné a PEEK kapiláře. Experimentální podmínky viz obr. 3.1 a 3.2. Výsledky jsou mediánem z deseti měření.

	Křemenná kapilára		PEEK kapilára	
	K <sup>+</sup>	Li <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Li <sup>+</sup>
Migrační čas [s]	20,6 ± 0,2	33,6 ± 0,4	21,1 ± 0,5	35,8 ± 1,3
Šířka píku v pol. výšky [s]	0,8 ± 0,0	1,2 ± 0,1	0,6 ± 0,0	0,7 ± 0,0
Výškový ekvivalent teoret. patra [μm]	21,7 ± 0,1	19,5 ± 0,1	14,3 ± 0,8	5,8 ± 0,2
Efektivní elektroforetická mobilita [cm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> V <sup>-1</sup> ] ×10 <sup>-4</sup>	6,5 ± 0,1	3,5 ± 0,4	6,8 ± 0,2	3,7 ± 0,1

Na elektroferogramech separací v jednotlivých kapilárách je vidět, že v kapiláře z materiálu PEEK došlo k téměř úplnému rozdělení vápenatého a sodného iontu, kdežto v křemenné kapiláře zůstávaly tyto ionty rozdělené neúplně. Důkazem jsou hodnoty parametru rozlišení v tabulce 3.2.

**Tab. 3.2.** Hodnoty rozlišení vápenatého a sodného iontu v křemenné kapiláře a v kapiláře z materiálu PEEK; výpočet z dat v tabulce 3.1.

	Křemenná kapilára	Kapilára PEEK
Rozlišení	0,5 ± 0,0	1,2 ± 0,0

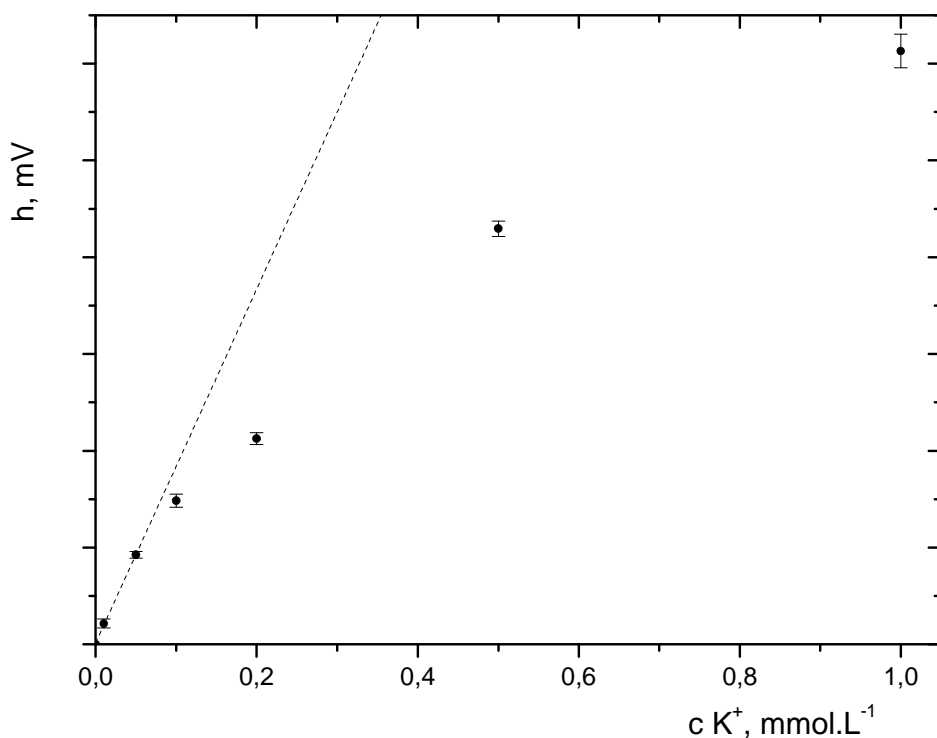
Jak lze vyčíst z tab. 3.1, migrační časy všech iontů se v kapiláře z materiálu PEEK poněkud prodloužily, protože v této kapiláře je menší rychlost elektroosmotického toku. To je také důvodem, proč došlo k téměř dokonalému rozdělení vápenatého a sodného iontu. Rozdíly však nejsou příliš velké, na horším rozlišení Na<sup>+</sup> Ca<sup>2+</sup> iontu v křemenné kapiláře se může podílet např. i jejich adsorpce na stěnách kapiláry. Stejným důvodem lze vysvětlit i menší šířku píků v kapiláře PEEK. Z tohoto důvodu je v kapiláře PEEK i vyšší separační účinnost, jak vyplývá z porovnání hodnot výškových ekvivalentů teoretického patra.

### 3.1.2 Kalibrační závislosti

Byla provedena kalibrace pro draselné a lithné ionty. Kalibrační závislosti byly proměřovány za stejných separačních podmínek jako úloha předešlá.

#### 3.1.2.1 Kalibrační závislost pro draselný ion

Pro kalibrační závislost plochy píku draselného iontu na jeho koncentraci v křemenné kapiláře byly použity kalibrační roztoky o těchto koncentracích:  $1 \times 10^{-4}$  M,  $5 \times 10^{-5}$  M,  $2 \times 10^{-5}$  M,  $1 \times 10^{-5}$  M,  $5 \times 10^{-6}$  M. V kapiláře PEEK byly použity kalibrační roztoky o koncentracích:  $1 \times 10^{-4}$  M,  $5 \times 10^{-5}$  M,  $2 \times 10^{-5}$  M,  $1 \times 10^{-5}$  M,  $5 \times 10^{-6}$  M,  $1 \times 10^{-6}$  M. Závislosti byly lineární, takže bylo možno jednotlivými body proložit regresní přímky, z jejichž směrnic a hodnot standardních chyb byly vypočítány limity detekce. Kalibrační parametry pro plochy píků draselného iontu a oba typy testovaných kapilár, detekční limity a lineární dynamický rozsah (LDR) jsou uvedeny v tabulce 3.3.



**Obr. 3.3.** Kalibrační závislost výšky píku draselného iontu na koncentraci v PEEK kapiláře o vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$  celkové délce 10 cm a efektivní délce 8 cm (5 kV/8  $\mu\text{A}$ , 20 mM MES/His pufr, pH 6,0). Každý bod je mediánem z 3 měření. Čárkovaně je znázorněna lineární část závislosti použitá pro výpočet limitu detekce.

Následovala kalibrační závislost výšky píku draselného iontu na jeho koncentraci, pro niž byly použity shodné koncentrace jako pro závislost předchozí. V křemenné kapiláře bylo opět dosaženo lineárního průběhu. V kapiláře PEEK, obr. 3.3, však byla tato závislost nelineární. Kalibrační parametry určené z výšek píků draselného iontu a hodnota LOD pro kapiláru PEEK odhadnutá pouze z odezev na dvě nejnižší koncentrace jsou uvedeny v tabulce 3.4.

**Tab. 3.3.** Zjištěné kalibrační parametry pro plochy píků pro stanovení draselného iontu elektroforézou v křemenné a PEEK kapiláře o vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$  celkové délce 10 cm a efektivní délce 8 cm (5 kV, 20 mM MES/His pufr, pH 6,0).

Kapilára	Směrnice [(mV s L mmol <sup>-1</sup> )]	Úsek [mV s]	Stand. chyba [(mV s L mmol <sup>-1</sup> )]	Korelační koeficient	LOD [mmol L <sup>-1</sup> ]	LDR [mmol L <sup>-1</sup> ]
křemenná	94,25 $\pm$ 1,69	-0,16 $\pm$ 0,08	0,14	0,999	4,60.10 <sup>-3</sup>	0 – 0,10
PEEK	64,36 $\pm$ 1,02	0,22 $\pm$ 0,11	0,14	0,999	6,43.10 <sup>-3</sup>	0 – 0,10

**Tab. 3.4.** Zjištěné kalibrační parametry pro výšky píků pro stanovení draselného iontu elektroforézou v křemenné a odhad hodnoty LOD v PEEK kapiláře o vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$  celkové délce 10 cm a efektivní délce 8 cm (5 kV, 20 mM MES/His pufr, pH 6,0).

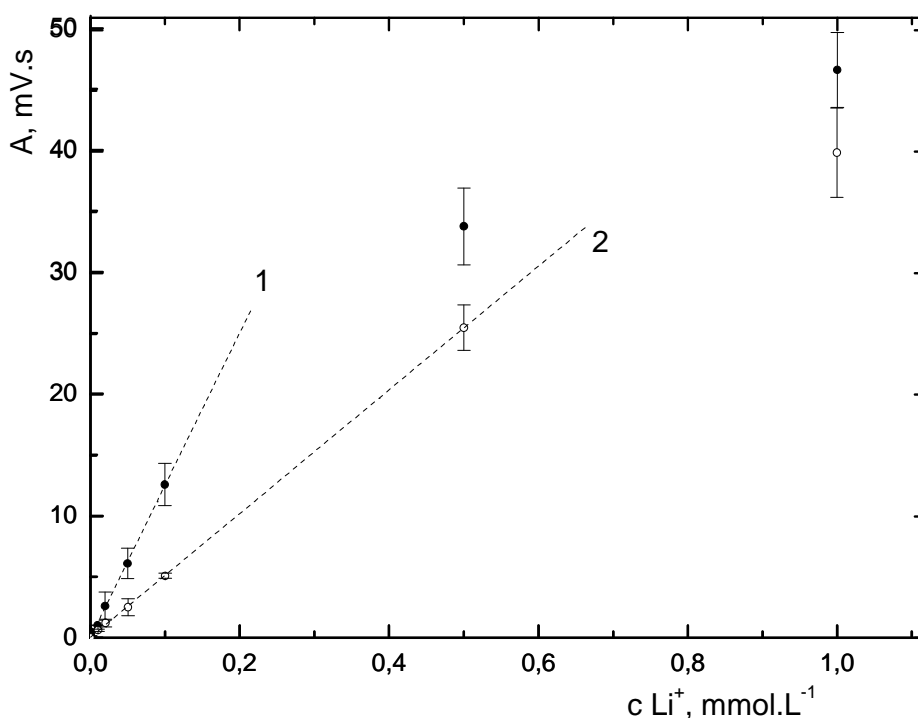
Kapilára	Směrnice [(mV s L mmol <sup>-1</sup> )]	Úsek* [mV s]	Stand. chyba [(mV s L mmol <sup>-1</sup> )]	Korelační koeficient	LOD [mmol L <sup>-1</sup> ]	LDR [mmol L <sup>-1</sup> ]
křemenná	165,92 $\pm$ 4,38	-	0,37	0,999	6,77.10 <sup>-3</sup>	0 – 0,10
PEEK	365,71 $\pm$ 10,72**	-	0,05	1**	3,79.10 <sup>-4</sup>	0 – 0,05

\*) U kalibrací pro výšky píků draselných iontů mohly být zanedbány hodnoty úseku, protože jejich nulové hodnoty ležely uvnitř intervalu spolehlivosti.

\*\*) Hodnoty určené pro dvě nejnižší testované koncentrace.

### 3.1.2.2 Kalibrační závislost pro lithný ion

Stejným postupem byly určeny kalibrační závislosti pro lithný ion. Pro konstrukci kalibrační závislosti v křemenné kapiláře z plochy a výšky píku lithného iontu byly použity roztoky o těchto koncentracích:  $1 \times 10^{-3}$  M,  $5 \times 10^{-4}$  M,  $1 \times 10^{-4}$  M,  $5 \times 10^{-5}$  M,  $2 \times 10^{-5}$  M,  $1 \times 10^{-5}$  M,  $2 \times 10^{-6}$  M,  $1 \times 10^{-6}$  M. V kapiláře PEEK byla použitelná nejnižší koncentrace pouze  $1 \times 10^{-5}$  M, nižší koncentrace nebylo možno do kalibrace zahrnout, protože výšky píků při těchto velmi malých koncentracích nebylo možné rozlišit od šumu. Kalibrační závislosti pro lithný ion, jak pro plochy, tak pro výšky píků v křemenné i PEEK kapiláře, nebyly nikdy v celém svém průběhu lineární; pro ilustraci viz kalibrační závislost na obr. 3.4. Limity detekce byly tedy vypočteny pouze z hodnot pro nejnižší koncentrace, pro něž lze závislostí proložit regresní přímku. Parametry těchto kalibračních přímek jsou uvedeny v tabulkách 3.5 a 3.6.



**Obr. 3.4.** Kalibrační závislost plochy píku lithného iontu na koncentraci v křemenné (1) a PEEK (2) kapiláře o vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$  celkové délce 10 cm a efektivní délce 8 cm (5 kV, 20 mM MES/His pufr, pH 6,0). Každý bod je mediánem z 3 měření. Čárkovaně jsou znázorněny lineární části závislosti použité pro výpočet limitu detekce.

**Tab. 3.5.** Zjištěné kalibrační parametry pro plochy píků pro stanovení lithného iontu elektroforézou v křemenné a PEEK kapiláře o vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$  celkové délce 10 cm a efektivní délce 8 cm (5 kV, 20 mM MES/His pufr, pH 6,0).

Kapilára	Směrnice [(mV s L mmol <sup>-1</sup> )]	Úsek [mV s]	Stand. chyba [(mV s L mmol <sup>-1</sup> )]	Korelační koeficient	LOD [mmol L <sup>-1</sup> ]	LDR [mmol L <sup>-1</sup> ]
křemenná	125,39 $\pm$ 2,09	-	0,16	0,999	3,92.10 <sup>-3</sup>	0 - 0,10
PEEK	50,71 $\pm$ 0,22	0,05 $\pm$ 0,04	0,09	0,999	5,59.10 <sup>-3</sup>	0 - 0,50

**Tab. 3.6.** Zjištěné kalibrační parametry pro výšky píků pro stanovení lithného iontu elektroforézou v křemenné a PEEK kapiláře o vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$  celkové délce 10 cm a efektivní délce 8 cm (5 kV, 20 mM MES/His pufr, pH 6,0).

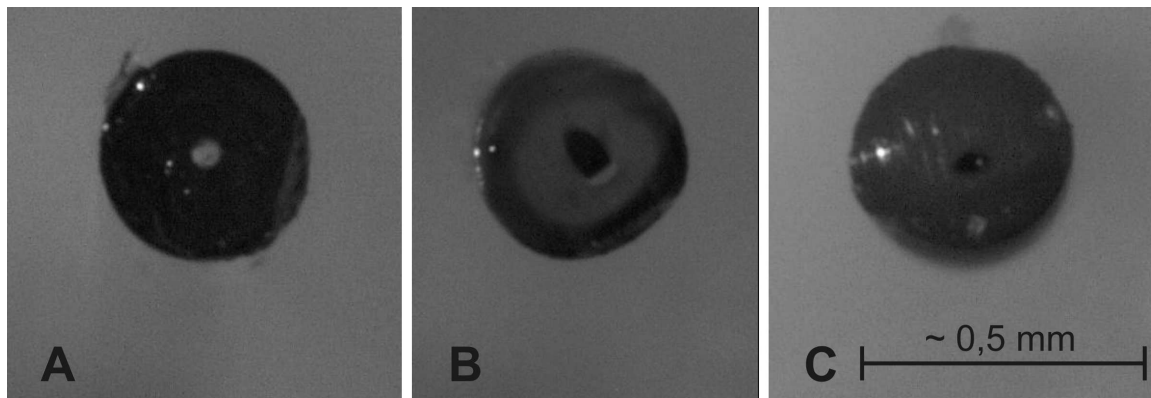
Kapilára	Směrnice [(mV s L mmol <sup>-1</sup> )]	Úsek [mV s]	Stand. chyba [(mV s L mmol <sup>-1</sup> )]	Korelační koeficient	LOD [mmol L <sup>-1</sup> ]	LDR [mmol L <sup>-1</sup> ]
křemenná	103,51 $\pm$ 2,99	0,22 $\pm$ 0,13	0,27	0,998	7,85.10 <sup>-3</sup>	0 – 0,10
PEEK	75,82 $\pm$ 3,72	0,36 $\pm$ 0,19	0,30	0,996	11,88.10 <sup>-3</sup>	0 – 0,10



### 3.1.3 Porovnání vlastností křemenné a PEEK kapiláry

Ze srovnání hodnot dosažených při jednotlivých stanovení v obou kapilárách je patrné, že téměř ve všech případech bylo dosaženo nižších detekčních limitů v kapiláře křemenné. Pro plochy píků tomu tak bylo pro oba ionty, pro výšky pak pro lithný ion.

Mechanické vlastnosti plastové kapiláry z materiálu PEEK jsou ve srovnání s křemennou kapilárou podstatně horší. Kapilára je velice snadno ohebná a vstup do kapiláry je při úpravě její délky řezáním snadno mechanicky deformovatelný. To je dokumentováno na obr. 3.5. Deformace vstupu do PEEK kapiláry vede k tomu, že za jinak stejných podmínek dávkování je do kapiláry nadávkováno jiné množství analytu než v případě kapiláry křemenné. Vliv na celkový signál má i relativní permitivita materiálu kapiláry:  $\epsilon_r$  křemene je přibližně 4, kdežto  $\epsilon_r$  PEEKu je jen přibližně 2. Materiál o vyšší hodnotě  $\epsilon_r$  klade průchodu střídavého elektrického proudu menší odpor, takže odezvy detektoru při použití křemenné kapiláry by měly být vyšší. Tomu odpovídají hodnoty směrnic kalibračních závislostí, viz data v tab. 3.3 až 3.6 (nelze brát v úvahu směrnici kalibrační závislosti pro výšku píku draselného iontu v kapiláře PEEK, tab. 3.4, byla určena pouze ze dvou bodů).



**Obr. 3.5.** Příčný řez křemennou kapilárou (A) a dva různé příčné řezy kapilárou PEEK (B, C). Vnější průměr kapilár je  $380\ \mu\text{m}$ , vnitřní  $50\ \mu\text{m}$ . Křemenná kapilára byla řezána keramickou destičkou All-Scribe FSOT Cutter (Alltech, USA), kapilára PEEK řezáčkem Clean-Cut Tubing Cutter (Alltech, USA). Fotografie byly pořízeny mikroskopem MZK 3701 (Intraco Micro, ČR).

Z elektroforetického hlediska je v kapiláře PEEK pomalejší elektroosmotický tok (EOF), takže látky setrvávají v kapiláře déle. To se projevuje lepší separační účinností, viz výše. Příčina vzniku EOF v PEEK kapiláře není zcela objasněná. Vzhledem k jeho struktuře je teoreticky neutrální a nemá na svém povrchu žádné nabitě skupiny [12]. Elektroosmotický tok však nezávisí pouze na podobě stacionární fáze, ale i na vlastnostech separačního pufru - permitivitě a viskozitě. Dále závisí na zeta potenciálu rozhraní pevná látka - roztok, tedy rozhraní stěna kapiláry - separační pufr. U kapilár, které nemají žádné ionizovatelné funkční skupiny, se EOF připisuje adsorpci iontů pufru na povrch kapiláry [5, 17].

## 3.2 Separace a stanovení sacharidů

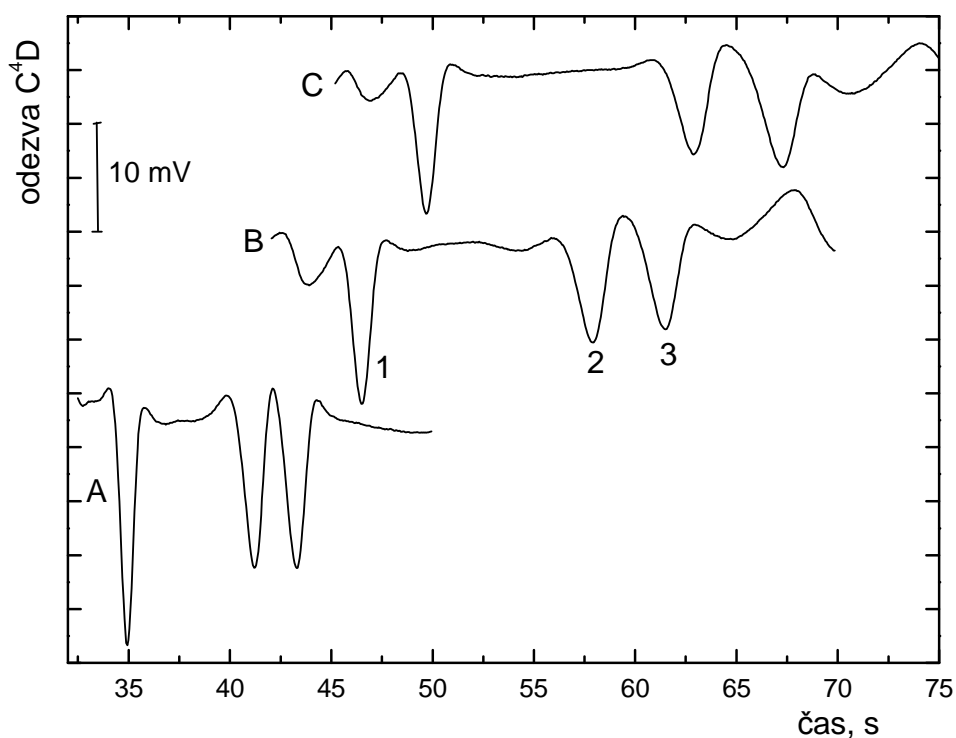
Hlavním cílem práce byla separace a stanovení sacharidů. Pro separaci sacharidů byla zvolena přímá metoda, tj. separace v silně alkalickém prostředí alkalického hydroxidu. Při této metodě není nutno analyty derivatizovat, viz kap. 1.1.7., a předúprava vzorku před analýzou je jednoduchá.

### 3.2.1 Sledování vlivu druhu hydroxidu

Nejprve byl testován vliv různých druhů hydroxidů v separačním elektrolytu na separační parametry. Vytvořená modelová směs tří nejběžnějších sacharidů o stejné koncentraci  $500 \text{ mg L}^{-1}$  byla tedy separována ve třech různých elektrolytech o koncentraci  $75 \text{ mmol L}^{-1}$ ; tato koncentrace byla převzata z literatury [48] jako optimální. Testovány byly roztoky KOH, NaOH a LiOH. Separace byla prováděna v křemenné kapiláře o vnitřním průměru  $10 \text{ }\mu\text{m}$ . Kapilára měla celkovou délku  $10 \text{ cm}$  a efektivní délku  $8 \text{ cm}$ . Separací napětí bylo  $5 \text{ kV}$ , proud procházející kapilárou  $14 \text{ }\mu\text{A}$  (KOH) a  $12 \text{ }\mu\text{A}$  (NaOH a LiOH). Na obrázku 3.7 jsou vyobrazeny elektroferogramy separace modelové směsi v jednotlivých elektrolytech. Získané základní separační parametry jsou uvedeny v tabulce 3.7. Parametr rozlišení pro glukózu a fruktózu je uveden v tabulce 3.8.

Porovnáním hodnot v tabulce 3.7 a elektroferogramů na obr. 3.7 lze dojít k závěru, že nejrychleji separace probíhají v hydroxidu draselném. To je způsobeno tím, že draselný ion má největší pohyblivost a proto lze v hydroxidu draselném pozorovat

největší elektroosmotický tok (zjištěná hodnota elektroosmotické mobility  $5,2 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). Naopak nejpomaleji separace probíhají v hydroxidu lithném, ve kterém je díky malé pohyblivosti lithného iontu elektroosmotický tok nejmenší ( $3,7 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). Nejlepšího rozlišení mezi dvěma nejbližší u sebe migrujícími sacharidy (glukózou a fruktózou) bylo dosaženo v hydroxidu lithném, a to právě díky delší době separace. U hydroxidu sodného bylo dosaženo kompromisu mezi dobou separace a rozlišením píků glukózy a fruktózy a byl tedy zvolen nejvhodnějším elektrolytem pro separace sacharidů. Proto byla všechna další měření prováděna v tomto elektrolytu. Účinnost separace je v tabulce 3.7 prezentována výškou teoretického patra, a jak je z výsledků patrné, nebyly rozdíly mezi jednotlivými elektrolyty nijak velké.



**Obr. 3.7.** Elektroforetická separace modelové směsi sacharózy (1), glukózy (2) a fruktózy (3) v 75mM KOH (A), NaOH (B) a LiOH (C); vzorek byl vodným roztokem tří výše uvedených sacharidů o koncentraci  $500 \text{ mg L}^{-1}$ ; křemenná kapilára, vnitřní průměr  $10 \text{ } \mu\text{m}$ , celková délka  $10 \text{ cm}$ , efektivní délka  $8 \text{ cm}$ , separační napětí  $5 \text{ kV}$ .

**Tab. 3.7.** Základní zjištěné separační parametry jednotlivých sacharidů v různých elektrolytech; křemenná kapilára, délka 10 cm, efektivní délka 8 cm, vnitřní průměr 10  $\mu\text{m}$ , separační napětí 5 kV.

Parametr	Migrační čas [s]			Efektivní mobilita $\times 10^{-4}$ [cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]			Výškový ekvivalent teor. patra [μm]		
	<i>Elektrolyt</i>	<i>KOH</i>	<i>NaOH</i>	<i>LiOH</i>	<i>KOH</i>	<i>NaOH</i>	<i>LiOH</i>	<i>KOH</i>	<i>NaOH</i>
sacharóza	35,0 ± 0,2	49,0 ± 0,4	50,3 ± 0,6	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,0	7,1 ± 0,4	6,3 ± 0,1	6,1 ± 0,3
glukóza	41,4 ± 0,4	61,4 ± 0,6	63,7 ± 0,8	1,3 ± 0,1	1,3 ± 0,0	1,2 ± 0,0	9,8 ± 0,9	8,6 ± 1,1	9,7 ± 0,5
fruktóza	43,4 ± 0,4	64,9 ± 0,3	68,1 ± 0,8	1,5 ± 0,0	1,5 ± 0,2	1,4 ± 0,0	8,3 ± 0,4	7,7 ± 1,6	9,2 ± 0,3

**Tab. 3.8.** Parametr rozlišení pro glukózu a fruktózu v různých elektrolytech; křemenná kapilára, délka 10 cm, efektivní délka 8 cm, vnitřní průměr 10  $\mu\text{m}$ , separační napětí 5 kV.

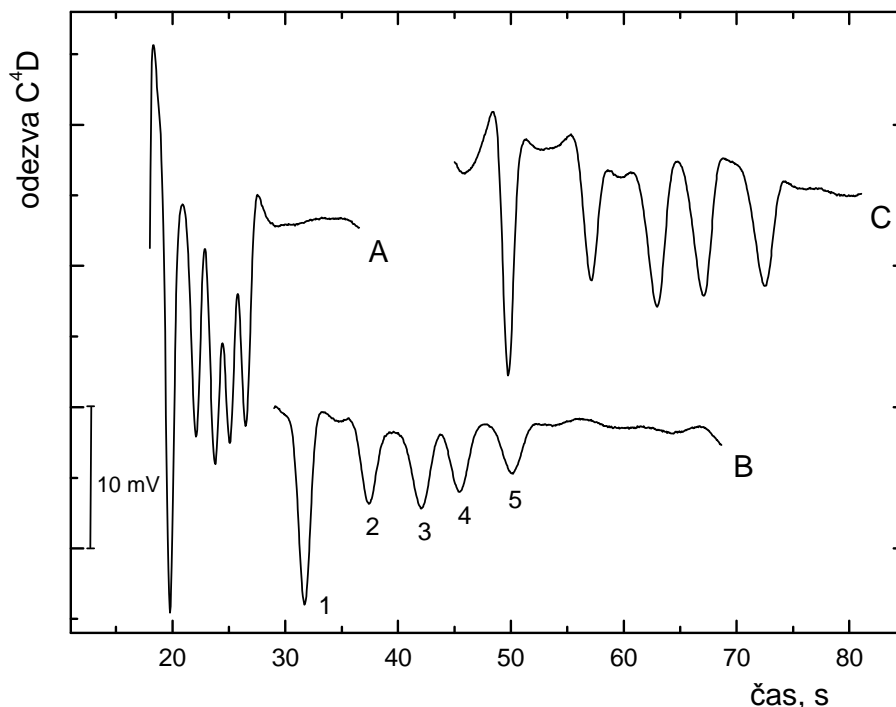
Hydroxid	Rozlišení Glu a Fru
KOH	1,2 $\pm$ 0,0
NaOH	1,4 $\pm$ 0,1
LiOH	1,5 $\pm$ 0,0

### 3.2.2 Separace sacharidů v modelových roztocích

Po určení nejvhodnějšího elektrolytu byl testován vliv délky kapiláry na separace sacharidů. Byly použity kapiláry s vnitřním průměrem 10  $\mu\text{m}$ , o celkové délce 10 cm a efektivní délce 8 a 4 cm. Jako elektrolyt byl použit 75mM NaOH. Separační napětí zůstalo stejné, tedy 5 kV. Tentokrát byla separována modelová směs, ve které bylo přítomno pět sacharidů a to: sacharóza, laktóza, glukóza, fruktóza a ribóza o stejné koncentraci 500  $\text{mg L}^{-1}$ . Na obrázku 3.8 jsou uvedeny elektroferogramy separací směsi sacharidů o obou testovaných efektivních délkách. V tabulce 3.9 jsou uvedeny získané separační parametry.

Ze srovnání výsledků vyplývá, že v kapiláře, která měla od dávkovacího konce k detektoru pouze 4 cm, se doba separace zkrátila oproti kapiláře osmicentimetrové asi

o 30 %. Očekávané zkrácení separační doby bylo 50 %. K tomu ovšem nedošlo. Důvodem může být skutečnost, že měření byla prováděna v různých dnech a nebylo dosaženo stejné rychlosti EOF; nestabilita EOF je známou nevýhodou CE.



**Obr. 3.8.** Elektroforetická separace modelové směsi sacharidů v 75mM NaOH (B+C) a 75mM KOH (A) v křemenné kapiláře, vnitřní průměr 10  $\mu\text{m}$ , celková délka 10 cm a efektivní délka 4 cm (A+B) a 8 cm (C); vzorek: vodný roztok sacharidů 1 – sacharóza, 2 – laktóza, 3 – glukóza, 4 – fruktóza, 5 – ribóza, o koncentraci 500  $\text{mg.L}^{-1}$ , separační napětí 5 kV.

Separační účinnost se sice ve čtyřcentimetrové kapiláře snížila, ale ne natolik výrazně, aby bylo použití takto krátké kapiláry nevhodné. Rozlišení se v kratší kapiláře také zhoršilo, protože analyty se za takto krátkou dobu nestihnou důkladněji rozdělit. I přesto bylo rozhodnuto, že pro všechna další měření bude použita kapilára o efektivní délce kratší, to znamená o celkové délce 10 cm a efektivní délce 4 cm. Cílem práce bylo vytvořit co nejrychlejší metodu pro stanovení sacharidů ve vzorcích, kde se vyskytují v poměrně vysokých koncentracích. Pro tyto účely jsou dosažené hodnoty separační účinnosti v čtyřcentimetrové kapiláře vyhovující. Pokud by bylo cílem práce pouze kvalitativní určení sacharidů, bylo by pro tyto účely, vzhledem k velké rychlosti separace, nejvhodnější použít čtyřcentimetrovou kapiláru s hydroxidem draselným.

Cílem této práce ovšem bylo jejich stanovení, proto byl pro použití v takto krátké kapiláře zvolen nejvhodnějším hydroxid sodný. Vysoké separační rychlosti v KOH by mohlo být s výhodou využito při analýzách vzorků obsahujících pouze sacharidy s velmi rozdílnými migračními časy.

Na základě provedených optimalizačních měření byly pro všechna další měření zvoleny následující experimentální podmínky: křemenná kapilára, vnitřní průměr 10  $\mu\text{m}$ , celková délka 10 cm, efektivní délka 4 cm, separační elektrolyt 75mM NaOH, separační napětí 5 kV.

**Tab. 3.9.** *Separační parametry jednotlivých sacharidů v různě dlouhých kapilárách (10/8 a 10/4); vzorek byl vodným roztokem sacharidů o stejné koncentraci 500 mg L<sup>-1</sup>; křemenná kapilára, vnitřní průměr 10 μm,, separační napětí 5 kV.*

Efektivní délka [cm]		8				4		
Parametr	Migrační čas [s]	Výškový ekvivalent teor. patra [μm]	Rozlišení		Migrační čas [s]	Výškový ekvivalent teor. patra [μm]	Rozlišení	
sacharóza	49,0 ± 0,4	6,3 ± 0,1			31,8 ± 1,2	11,1 ± 0,9		
laktóza	56,0 ± 0,4	7,3 ± 1,0	lak/glu	2,3 ± 0,2	37,9 ± 1,5	11,9 ± 2,2	lak/glu	1,7 ± 0,2
glukóza	61,4 ± 0,6	8,6 ± 1,1	glu/fru	1,4 ± 0,1	42,7 ± 1,7	12,0 ± 4,2	glu/fru	1,1 ± 0,2
fruktóza	64,9 ± 0,3	7,7 ± 1,6	fru/rib	2,0 ± 0,2	46,1 ± 2,0	10,8 ± 2,1	fru/rib	1,5 ± 0,1
ribóza	69,7 ± 0,6	5,2 ± 0,7			51,1 ± 2,3	11,5 ± 2,4		

### 3.2.3 Koncentrační závislosti v modelových roztocích

Lze očekávat, že matrice potravinářských vzorků může stanovení sacharidů ovlivňovat. Po optimalizaci všech podmínek proto bylo nutné zjistit, zda jsou koncentrační závislosti u jednotlivých sacharidů lineární a bude možné použít k jejich kvantifikaci metodu standardního přídávku. Byly tedy připraveny kalibrační řady roztoků a z naměřených hodnot byly určovány parametry kalibračních závislostí a limity detekce.

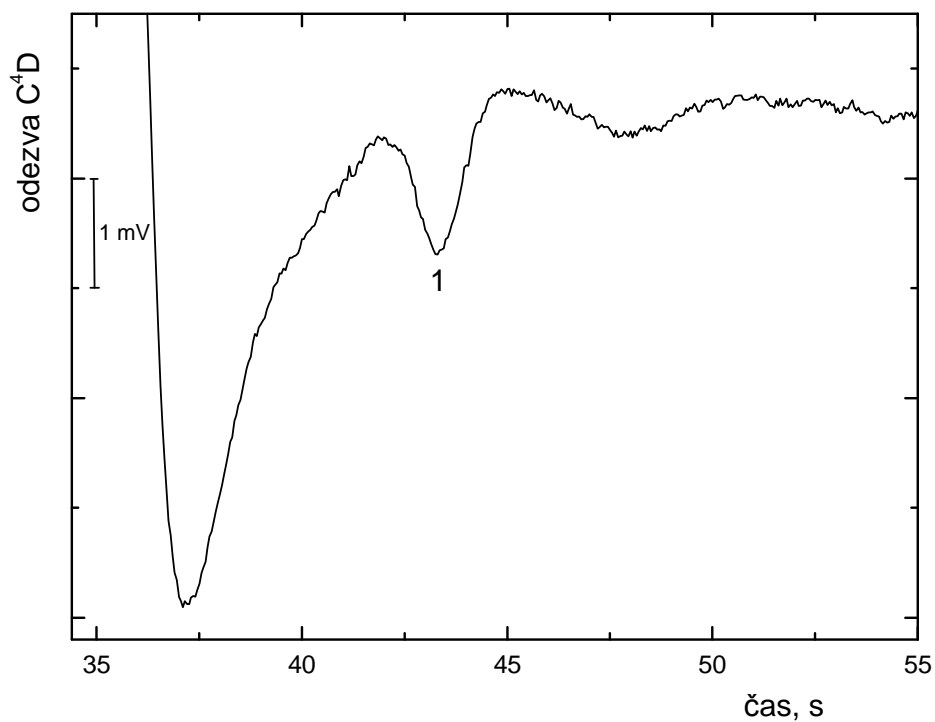
Bylo zjištěno, že všechny koncentrační závislosti jsou lineární, parametry kalibračních přímk jsou uvedeny v tabulce 3.10. Z toho vyplývá, že pro stanovení sacharidů lze použít metodu standardního přídávku. Pokud by byla koncentrace sacharidů určována přímo z uvedených kalibračních přímk, bylo by možno u sacharózy a glukózy ve výpočtech zanedbat úsek, protože jeho nulová hodnota leží uvnitř intervalu spolehlivosti. U zbývajících sacharidů tomu tak není, takže je nutné s úsekem počítat.

Hodnoty LOD uvedené v tab. 3.10 byly určovány výpočtem z rov. 2-10, tj. z parametrů regresní kalibrační přímky. Tento postup zohledňuje fluktuace signálu pozorované na základní linii, které ovlivňují hodnotu standardní chyby při regresní analýze a tím i hodnotu LOD. To je demonstrováno na obrázku 3.9, kde je uveden elektroferogram separace glukosy o koncentraci  $50 \text{ mg.L}^{-1}$ , tj. o koncentraci pouze asi  $2,5\times$  vyšší, než stanovený LOD. Je patrný výrazný rozdíl mezi signálem odpovídajícím této koncentraci glukosy (výška píku asi  $1 \text{ mV}$ ) a fluktuacemi na základní linii pozorované za píkem glukosy. To demonstruje reálnost limitů detekce uvedených v tabulce 3.10.

K prakticky stejné hodnotě LOD lze dospět i jiným, často používaným způsobem, tj. dosazením hodnoty signálu rovné trojnásobku amplitudy šumu do kalibrační rovnice. Amplituda šumu na základní linii je asi  $0,15 \text{ mV}$ , pak tedy

$$LOD = \frac{0,45}{0,021} = 21 \text{ mg L}^{-1}.$$





**Obr. 3.9.** Signál glukózy (1) o koncentraci  $50 \text{ mg L}^{-1}$ . Pík na počátku záznamu je konec odezvy na nástřikovou zónu (tzv. water-gap).

**Tab. 3.10.** Parametry kalibračních přímek pro jednotlivé sacharidy.

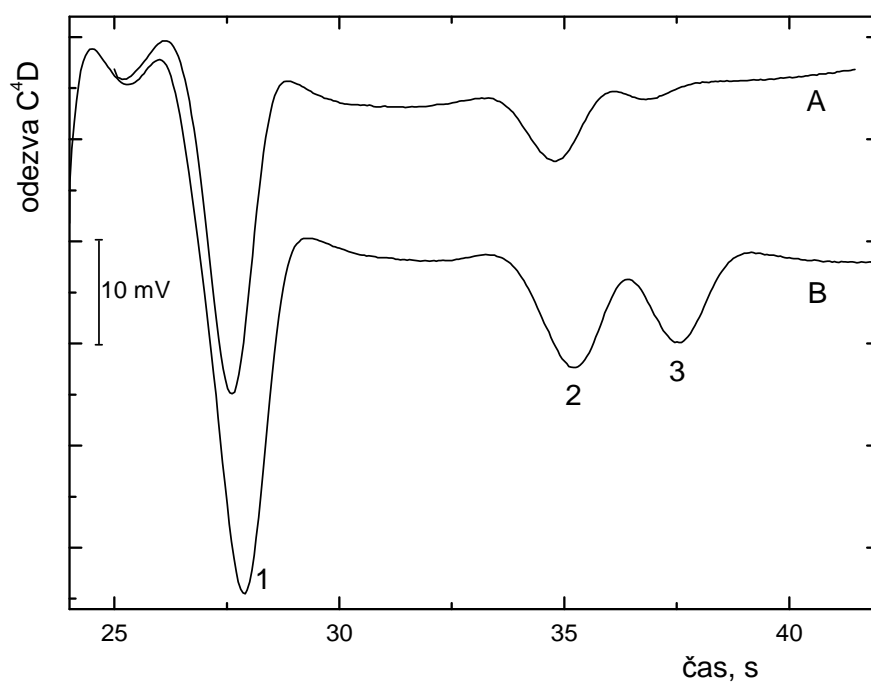
Cukr	Směrnice [mV s L mg <sup>-1</sup> ]	Úsek [mV s]	Stand. chyba [mV s L mg <sup>-1</sup> ]	Korelační koeficient	LOD [mg L <sup>-1</sup> ]
<b>Sach</b>	$0,035 \pm 0,000$	-	0,178	0,999	15,26
<b>Lak</b>	$0,018 \pm 0,000$	$-0,349 \pm 0,131$	0,241	0,999	40,17
<b>Glu</b>	$0,021 \pm 0,000$	-	0,134	0,999	19,14
<b>Fru</b>	$0,013 \pm 0,000$	$-0,089 \pm 0,037$	0,067	0,999	15,46
<b>Rib</b>	$0,013 \pm 0,000$	$0,511 \pm 0,092$	0,613	0,996	141,46

### 3.2.4 Stanovení sacharidů v energetických nápojích

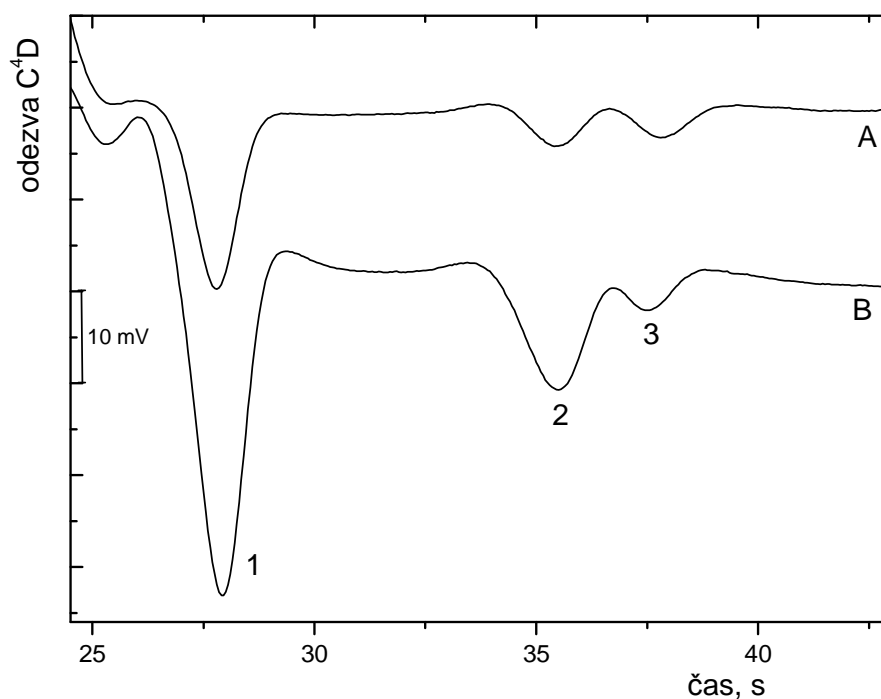
Ve všech testovaných nápojích byly přítomny tři sacharidy a to: sacharóza, glukóza a fruktóza, i když v některých případech nebyly specifikovány na etiketě nádoby s nápojem. Na obrázku 3.10 jsou pro ilustraci uvedeny elektroferogramy separace sacharidů v energetických nápojích Red Bull a Burn, v nichž byl určen největší rozdíl v obsahu fruktózy. Na obrázku 3.11 jsou uvedeny elektroferogramy separace sacharidů v nápojích Kamikaze a KX.

Nejprve byly sacharidy stanoveny výpočtem z parametrů kalibrační přímky uvedených v tabulce 3.10. Zjištěné hodnoty koncentrací jsou v tab. 3.11. Na etiketách na obalech nápojů nejsou uváděny koncentrace jednotlivých sacharidů, ale pouze celkový cukr, takže lze porovnávat pouze získané hodnoty celkového cukru s hodnotami deklarovanými výrobcem. U metody kalibrační přímky byly vypočtené hodnoty odlišné (viz tabulka 3.11), u dvou nápojů, Red Bull a KX, velice výrazně. To bylo s největší pravděpodobností způsobeno vlivem matrice reálných vzorků na stanovení a tedy vzájemnou neslučitelností s kalibračními závislostmi získanými v připravených modelových vzorcích.

Z uvedeného důvodu byla další stanovení prováděna metodou standardního přídatku. Zjištěné hodnoty koncentrací jsou uvedeny v tabulce 3.12. Jak lze vyčíst z výsledků v tabulce 3.12, metodou standardního přídatku bylo dosaženo velmi uspokojivých výsledků. Stanovené hodnoty se velmi přibližují hodnotám uváděným výrobcem. V případě nápojů Red Bull a KX leží hodnota uváděná výrobcem uvnitř intervalu spolehlivosti hodnoty stanovené. Je tedy zřejmé, že vhodnější metodou pro stanovení sacharidů v energetických nápojích je metoda standardního přídatku.



**Obr. 3.10.** Elektroferogramy separace směsi sacharidů v energetických nápojích Red Bull (A) a Burn (B) zředěných deionizovanou vodou 1:50; 1 – sacharóza, 2 – glukóza, 3 – fruktóza.



**Obr. 3.11.** Elektroferogramy separace směsi sacharidů v energetických nápojích KX (A) a Kamikaze (B) zředěných deionizovanou vodou 1:50; 1 – sacharóza, 2 – glukóza, 3 – fruktóza.

**Tab. 3.11.** Stanovení sacharidů metodou kalibračního grafu. Výrobce uváděný obsah cukru viz tabulka 3.12.

Nápoj	Sacharóza [g L <sup>-1</sup> ]	Glukóza [g L <sup>-1</sup> ]	Fruktóza [g L <sup>-1</sup> ]	Celkový cukr [g L <sup>-1</sup> ]	Rozdíl od uváděné hodnoty [%]
<b>Red Bull</b>	48,8 ± 0,5	25,9 ± 3,0	5,7 ± 1,5	80,5 ± 1,0	27
<b>KX</b>	44,8 ± 5,5	27,5 ± 0,6	22,2 ± 0,5	94,4 ± 2,8	15
<b>Kamikaze</b>	65,9 ± 1,1	43,1 ± 2,5	12,8 ± 0,9	121,2 ± 1,3	7
<b>Burn</b>	72,1 ± 2,9	30,1 ± 1,1	32,6 ± 0,2	134,7 ± 1,7	1

**Tab. 3.12.** Stanovení sacharidů metodou standardního přídatku.

Nápoj	Sacharóza [g L <sup>-1</sup> ]	Glukóza [g L <sup>-1</sup> ]	Fruktóza [g L <sup>-1</sup> ]	Celkový cukr [g L <sup>-1</sup> ]	Uváděná hodnota [g L <sup>-1</sup> ]
<b>Red Bull</b>	59,5 ± 0,1	43,1 ± 7,9	4,6 ± 0,7	106,4 ± 5,2	110
<b>KX</b>	52,2 ± 12,3	42,8 ± 13,1	19,5 ± 1,4	114,5 ± 5,5	111
<b>Kamikaze</b>	56,8 ± 2,1	51,0 ± 3,2	8,9 ± 0,8	116,1 ± 2,9	113
<b>Burn</b>	75,0 ± 4,8	38,1 ± 0,3	31,8 ± 5,1	144,9 ± 4,0	133

## 4. Závěr

Aparatura sestavená pro elektroforetické separace v krátké kapiláře byla použita k separacím vybraných anorganických iontů ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  a  $Li^+$ ) a neutrálních mono- a disacharidů.

Nejprve byla funkčnost systému ověřena při separacích anorganických iontů. Ty byly prováděny v křemenné a PEEK kapiláře o vnitřním průměru 50  $\mu m$ , celkové délce 10 cm a efektivní délce 8 cm. Pufrem byl 20mM MES/His o pH 6,0. V křemenné kapiláře separace proběhla do 40 s, v kapiláře z materiálu PEEK do 50 s.

Poté byly optimalizovány podmínky pro separace sacharidů. Nejlépe se pro tyto účely osvědčila křemenná kapilára s vnitřním průměrem 10  $\mu m$ , celkovou délkou 10 cm a efektivní délkou 4 cm. Nejvhodnějším separačním elektrolytem byl po sérii pokusů zvolen 75mM NaOH. Za těchto podmínek trvala celá separace modelového roztoku sacharidů (sacharózy, laktózy, glukózy, fruktózy a ribózy) necelou minutu. I přes velmi výrazné zrychlení separací bylo dosaženo dobrých hodnot separačních účinností.

V poslední fázi pokusů byl systém testován při separacích sacharidů v reálných vzorcích, tedy v energetických nápojích. Vzhledem k tomu, že tyto nápoje obsahují jen sacharózu, glukózu a fruktózu, trvala celá separace necelých 40 s. Sacharidy byly v jednotlivých nápojích stanovovány metodou standardního přídatku, která poskytla velmi dobré výsledky a metodou kalibrační přímky, u níž byly hodnoty mírně rozdílné. To bylo nejspíše způsobeno vlivem matrice reálných vzorků na stanovení.

**Závěrem lze tedy konstatovat, že cíl práce byl splněn. Laboratorně sestavená aparatura pro elektroforetické separace s krátkou kapilárou byla testována na směsi anorganických iontů a poté optimalizována pro separace neutrálních mono- a disacharidů. Ty byly nejprve stanovovány v uměle vytvořených směsích a na závěr byl stanoven obsah cukru v energetických nápojích. Metoda je aparaturně i provozně jednoduchá a výhodná především pro takové analýzy, kdy není prioritní dosažení nízkých detekčních limitů stanovovaných látek, ale důležitá je rychlost získání analytického výsledku. S takovými požadavky se lze setkat právě při analýzách velkého počtu vzorků, např. v potravinářských laboratořích.**

## Použitá literatura

1. Gaš, B.: *Vesmír* **80**, 370 (2001)
2. Sobotníková, J., Bosáková, Z., Čabala, R., Coufal, P., Pacáková, V., Štulík, K.: *Chem. Listy* **104**, 1226 (2010)
3. Štulík, K. a kol.: *Analytické separační metody*. Praha, Karolinum 2004
4. Tanyaniwa, J., Leuthardt, S., Hauser, P. C.: *J. Chromatogr. A* **978**, 205 (2002)
5. Lukacs, K. D., Jorgenson, J. W.: *J. High Resolut. Chromatogr.* **8**, 407 (1985)
6. Timerbaev, A. R.: *Electrophoresis* **25**, 4008 (2004)
7. Kašička, V.: *Chem. Listy* **91**, 320 (1997)
8. Piñero, M.-Y., Bauza, R., Arce, L.: *Electrophoresis* **32**, 1379 (2011)
9. Rovio, S., Sirén, K., Sirén, H.: *Food Chem.* **124**, 1194 (2011)
10. Coufal, P., Zuska, J., van de Goor, T., Smith, V., Gaš, B.: *Electrophoresis* **24**, 671 (2003)
11. Altria, K. D.: *J. Chromatogr. A* **856**, 443 (1999)
12. Tagliaro, F., Manetto, G., Crivellente, F., Smith, F. P.: *Forensic Science International* **92**, 75 (1998)
13. Rabanes, H. R., Guidote Jr., A. M., Quirino, J., P.: *Electrophoresis* **33**, 180 (2012)
14. Piaggio, M. V., Deiber, J. A.: *Latin American Applied Research* **33**, 261 (2003)
15. Knjazeva, T., Kulp, M., Kaljurand, M.: *Electrophoresis* **30**, 424 (2009)
16. Benavente, F., Sanz-Nebot, V., Barbosa, J., van der Heijden, R., van der Greef, J., Hankemeier, T.: *Electrophoresis* **28**, 944 (2007)
17. Fujimoto, Ch., Sakurai, M., Muranaka, Y.: *J. Microcol. Sep.* **11**, 693 (1999)
18. Schneider, P. J., Engelhardt, H.: *J. Chromatogr. A* **802**, 17 (1998)
19. Miller, L., Juza, M.: *J. Chromatogr. A* **1094**, 165 (2005)
20. Montero, C. M., Dodero, M. C. R., Sánchez, D. A. G., Barroso, C. G.: *Chromatographia* **59**, 15 (2004)
21. da Silva, J. A. F., Ricelli, N. L., Carvalho, A. Z., do Lago, C. L.: *J. Braz. Chem. Soc.* **14**, 265 (2003)
22. Zemann, A. J.: *Electrophoresis* **24**, 2125 (2003)
23. Mayrhofer, K., Zemann, A. J., Schnell, E., Bonn, G. K.: *Anal. Chem.* **71**, 3828 (1999)
24. Zemann, A. J., Schnell, E., Volgger, D., Bonn, G. K.: *Anal. Chem.* **70**, 563 (1998)

25. Šolínová, V., Kašička, V.: *J. Sep. Sci.* **29**, 1743 (2006)
26. Tůma, P., Samcová, E., Duška, F.: *J. Sep. Sci.* **31**, 2260 (2008)
27. Rainelli, A., Hauser, P. C.: *Anal. Bioanal. Chem.* **382**, 789 (2005)
28. da Silva, J. A. F., do Lago, C. L.: *Anal. Chem.* **70**, 4339 (1998)
29. Opekar, F., Štulík, K.: *Chem. Listy* **104**, 1148 (2010)
30. Tanyanyiwa, J., Hauser, P. C.: *Electrophoresis* **23**, 3781 (2002)
31. Gaš, B., Zuska, J., Coufal, P., van de Goor, T.: *Electrophoresis* **23**, 3520 (2002)
32. Zemmann, A. J.: *Trends Anal. Chem.* **20**, 346 (2001)
33. Pumera, M., Wang, J., Opekar, F., Jelínek, I., Feldman, J., Löwe, H., Hardt, S.: *Anal. Chem.* **74**, 1968 (2002)
34. Guijt, R. M., Evenhuis, Ch. J., Macka, M., Haddad, P. R.: *Electrophoresis* **25**, 4032 (2004)
35. Tanyanyiwa, J., Abad-Villar, E. M., Hauser, P. C.: *Electrophoresis* **25**, 903 (2004)
36. Shang, F., Guihen, E., Glennon, J. D.: *Electrophoresis* **33**, 105 (2012)
37. Dolnik, V., Liu, S.: *J. Sep. Sci.* **28**, 1994 (2005)
38. Terry, S. C., Jerman, J. H., Angell, J. B.: *IEEE Transaction on Electron Devices* **26**, 1880 (1979)
39. Manz, A., Graber, N., Widmer, H. M.: *Sens. Actuators B: Chemical* **1**, 244 (1990)
40. Opekar, F., Coufal, P., Štulík, K.: *Chem. Rev.* **109**, 4487 (2009)
41. Wu, X.-Z., Pawliszyn, J.: *Electrophoresis* **23**, 542 (2002)
42. Yin, X.-B., Kang, J., Fang, L., Yang, X., Wang, E.: *J. Chromatogr. A* **1055**, 223 (2004)
43. Zhang, Y., Lee, H. K., Li, S. F. Y.: *Talanta* **45**, 613 (1998)
44. Yang, W., Zhang, Z.: *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **82**, 353 (2002)
45. Yang, W., Zhang, Z.: *Anal. Lett.* **36**, 465 (2003)
46. Guttman, A.: *J. Chromatogr. A* **763**, 271 (1997)
47. Carvalho, A. Z., da Silva, J. A. F., do Lago, C. L.: *Electrophoresis* **24**, 2138 (2003)
48. Tůma, P., Málková, K., Samcová, E., Štulík, K.: *Anal. Chim. Acta* **698**, 1 (2011)
49. Soga, T., Serwe, M.: *Food Chem.* **69**, 339 (2000)
50. Voet, D., Voetová, J. G.: *Biochemie*, Praha, Victoria Publishing a. s., 1995
51. Černý, M., Trnka, T., Buděšínský, M.: *Sacharidy*, Praha, ČSCH, 2010
52. IUPAC-IUBMB Joint Commission on Biochemical Nomenclature: *Nomenclature of*

- Carbohydrates*. Dostupné z URL: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/2carb/>> [cit. 13.3.2012]
53. Cataldi, T. R. I., Margiotta, G., Zambonin, C. G.: *Food Chem.* **62**, 109 (1998)
54. Tisza, S., Molnár-Perl, I., Friedman, M., Sass, P.: *J. High Resolut. Chromatogr.* **19**, 54 (1996)
55. Bassi, D., Bartolozzi, F., Muzzi, E.: *Plant Breeding* **115**, 67 (1996)
56. Yuan, J. P., Chen, F.: *Food Chem.* **64**, 423 (1999)
57. Wei, Y., Ding, M. Y.: *J. Chromatogr. A* **904**, 113 (2000)
58. Yan, Z., Xingde, Z., Weijun, N.: *Mikrochim. Acta* **127**, 189 (1997)
59. Akiyama, S., Nakashima, K., Yamada, K.: *J. Chromatogr. A* **626**, 266 (1992)
60. Gey, M. H., Unger, K. K., Battermann, G.: *Fresenius J. Anal. Chem.* **356**, 339 (1996)
61. Huang, X., Pot, J. J., Kok, W. T.: *Chromatografia* **40**, 684 (1995)
62. Mendes, E., Brojo, E., Ferreira, I. M. P. L. V. O., Ferreira, M. A.: *Carbohydr. Polym.* **37**, 219 (1998)
63. Katona, Z. F., Sass, P., Molnár-Perl, I.: *J. Chromatogr. A* **847**, 91 (1999)
64. Ratsimba, V., García, J. M., Defaye, J., Nigay, H., Voilley, A.: *J. Chromatogr. A* **844**, 283 (1999)
65. Molnár-Perl, I., Horváth, K.: *Chromatographia* **45**, 321 (1997)
66. Horváth, K., Molnár-Perl, I.: *Chromatographia* **45**, 328 (1997)
67. Klampfl, Ch. W., Buchberger, W.: *Electrophoresis* **22**, 2737 (2001)
68. Ye, J., Baldwin, R. P.: *J. Chromatogr. A* **687**, 141 (1994)
69. Klockow, A., Paulus, A., Figueiredo, V., Amado, R., Widmer, H. M.: *J. Chromatogr. A* **680**, 187 (1994)
70. Chen, M. C., Huang, H. J.: *Anal. Chim. Acta* **341**, 83 (1997)
71. Noe, C. R., Freissmuth, J.: *J. Chromatogr. A* **704**, 503 (1995)
72. Zhang, X., Cao, Y., Ye, J.: *Food Chem.* **72**, 385 (2001)
73. Honda, S.: *J. Chromatogr. A* **720**, 337 (1996)
74. Vorndran, A. E., Grill, E., Huber, C., Oefner, P. J., Bonn, G. K.: *Chromatographia* **34**, 109 (1992)
75. Tseng, H.-M., Gattolin, S., Pritchard, J., Barrett, D. A.: *Electrophoresis* **30**, 1399 (2009)



76. Campa, C., Coslovi, A., Flamigni, A., Rossi, M.: *Electrophoresis* **27**, 2027 (2006)
77. Chu, Q. C., Fu, L., Guan, Y. Q., Ye, J. N.: *J. Sep. Sci* **28**, 234 (2005)
78. Castro-Puyana, M., García-Cañas, V., Simó, C., Cifuentes, A.: *Electrophoresis* **33**, 147 (2012)
79. Zemann, A., Nguyen, D. T., Bonn, G.: *Electrophoresis* **18**, 1142 (1997)
80. Podhorná, P.: *Diplomová práce* (2011)
81. Opekar, F.: *Chem. Listy* **106**, 289 (2012)
82. Tůma, P., Opekar, F., Jelínek, I.: *J. Chromatogr. A* **883**, 223 (2000)
83. Tůma, P., Opekar, F., Štulík, K.: *Electrophoresis* **23**, 3718 (2002)
84. Novotný, M., Opekar, F., Jelínek, I.: *Chem. Listy* **99**, 132 (2005)
85. <http://www.alldatasheet.com/datasheet-pdf/pdf/72720/MAXIM/MAX038.html> [cit. 13. 3. 2012]
86. Coufal, P., Bosáková, Z., Čabala, R., Suchánková, J., Feltl, L.: *Seminář z analytické chemie, Teorie, příklady, cvičení*. Praha, Karolinum 2007
87. Doc. RNDr. Ing. Petr Tůma Ph.D. – 3. LF UK – soukromé sdělení